

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

EAP. DE MEDICINA VETERINARIA

**Detección de residuos de oxitetraciclina en huevos de
gallinas medicadas bajo vía oral y en diferentes dosis**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Daniel Alberto MAEKAWA MAEDA

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA

Lima - Perú

2008

DEDICATORIA

Esta Tesis está dedicada a mis
padres Javier Maekawa y
Carolina Maeda, por todo el
apoyo, amor y comprensión que
me brindan continuamente.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis la Dra. Sonia Calle Espinoza por su amor, cariño y amistad brindada a lo largo de toda mi etapa universitaria.

A mis asesores de Tesis el Dr. Néstor Falcón, la Dra. Chris Pinto, el Ing. Miguel Ara, y el Dr. John Guzmán, por su tiempo, dedicación y confianza para el desarrollo y culminación de la tesis.

Al Dr. Miguel Morales y a todas las personas que forman parte del laboratorio de Bacteriología de la FMV - UNMSM.

A Sandra Armas Reynoso por su infinito amor, especial dedicación e incomparable apoyo.

A todos mis amigos y familiares por su paciencia, comprensión y apoyo permanente.

Por último a la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM por las facilidades brindadas en la elaboración de la presente tesis

TABLA DE CONTENIDO

Certificación de la Tesis.....	ii
Acta de Sustentación.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Tabla de Contenido.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
Lista de Figuras	xv
Lista de Cuadros	xvi
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. EL HUEVO.....	3
2.1.1. Estructura del Huevo.....	4
2.1.1.1. La Cáscara.....	5
2.1.1.2. La Clara o Albumen.....	6
2.1.1.3. La Yema.....	6
2.1.1.3.1. Lípidos de la yema.....	7
2.1.1.3.2. Proteínas de la yema.....	7
2.1.1.3.3. Minerales de la yema.....	7
2.1.1.3.4. Carbohidratos de la yema.....	7
2.1.1.3.5. Pigmentos de la yema.....	7
2.1.2. El huevo en la Alimentación.....	8
2.1.3. Los Ovoproduitos.....	8
2.2. LOS ANTIBIÓTICOS.....	9
2.2.1. Clasificación de los Antibióticos.....	9
2.2.1.1. Según el Mecanismo de Acción en la Bacteria.....	9
2.2.1.1.1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.....	9
2.2.1.1.2. Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad.....	10
2.2.1.1.3. Antibióticos que inhiben la síntesis proteica.....	10

2.2.1.1.4. Antibióticos que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos...	10
2.2.1.2. Según si eliminan las bacterias o inhiben el crecimiento de las mismas.....	11
2.2.1.2.1. Bactericidas.....	11
2.2.1.2.2. Bacteriostáticos.....	11
2.2.1.3. Según su Espectro de Acción.....	12
2.2.1.3.1. Antibióticos de Amplio Espectro.....	12
2.2.1.3.2. Antibióticos de Espectro Reducido.....	12
2.2.1.4. Según sus fines de utilización.....	12
2.2.1.4.1. Fines Profilácticos.....	12
2.2.1.4.2. Fines Terapéuticos.....	12
2.2.2. Vías de Administración de los Antibióticos.....	13
2.2.2.1. Vía Oral.....	13
2.2.2.1.1. Medicación en el Agua de Bebida.....	13
2.2.2.1.2. Medicación en el Alimento.....	13
2.2.2.2. Vía Parenteral.....	14
2.3. LAS TETRACICLINAS.....	14
2.3.1. Origen.....	14
2.3.2. Estructuras y Características Fisicoquímicas.....	14
2.3.3. Mecanismo de Acción.....	15
2.3.4. Espectro Antimicrobiano.....	16
2.3.5. Resistencia Antibacteriana.....	17
2.3.6. Farmacocinética.....	17
2.3.6.1. Absorción.....	17
2.3.6.2. Distribución.....	18
2.3.6.3. Metabolismo.....	18
2.3.6.4. Eliminación.....	18
2.3.7. Interacciones Farmacológicas.....	19
2.3.8. Reacciones Adversas.....	20
2.3.9. Toxicidad.....	20
2.3.10. Utilización Clínica.....	21
2.3.10.1. Aves.....	21
2.3.10.2. Bovinos.....	22
2.3.10.3. Caninos.....	22

2.3.10.4. Porcinos.....	23
2.4. EFECTO DE LOS RESIDUOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LA SALUD PÚBLICA.....	23
2.4.1. Efectos Toxicológicos.....	23
2.4.1.1. Efectos Directos.....	23
2.4.1.2. Efectos Indirectos.....	24
2.4.1.2.1. Reacciones de Hipersensibilidad.....	24
2.4.1.2.2. Resistencia Bacteriana.....	25
2.4.1.2.2.1. Tipos de Resistencia.....	25
2.4.1.2.2.1.1. Natural o Intrínseca.....	25
2.4.1.2.2.1.2. Adquirida.....	26
2.4.2. Aspectos Toxicológicos.....	26
2.4.2.1. Nivel Sin Efectos Adversos Observables (NOEL).....	26
2.4.2.2. Ingestión Diaria Admisible (IDA).....	27
2.4.2.3. Límite Máximo de Residuos (LMR).....	27
2.4.2.3.1. LMR de la Oxitetraciclina.....	28
2.4.2.4. Periodo de Descanso.....	29
2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS ANTIBIÓTICOS.....	29
2.5.1. Clasificación de los Métodos.....	29
2.5.1.1. Tipo I.....	29
2.5.1.2. Tipo II.....	30
2.5.1.3. Tipo III.....	30
2.5.2. Propiedades de los Métodos de Detección.....	30
2.5.2.1. Especificidad.....	30
2.5.2.2. Precisión.....	30
2.5.2.3. Exactitud.....	30
2.5.2.4. Sensibilidad.....	31
2.5.3. Métodos Screening o de Cribado.....	31
2.5.3.1. Métodos Microbiológicos.....	31
2.5.3.1.1. Bacterias Utilizadas en las Pruebas Microbiológicas.....	32
2.5.3.1.2. Métodos de Difusión Agar.....	33
2.5.3.1.2.1. Formación de una Zona de Inhibición.....	33
2.5.3.1.2.2. Composición del Medio de Crecimiento.....	34

2.5.3.1.2.3. Métodos de difusión agar usados comúnmente y su límites de detección (LOD).....	35
2.5.3.1.2.4. Zonas de Inhibición Inespecíficas.....	35
2.5.3.2. Métodos Inmunoquímicos.....	36
2.5.3.3. Otras Técnicas Usadas en el Screening e Identificación de Residuos.....	38
2.5.4. Métodos Cuantitativos Confirmatorios.....	39
2.6. RESIDUOS ANTIBIÓTICOS EN HUEVOS.....	40
2.6.1. Residuos de Tetraciclinas en Huevos.....	42
2.7. RESIDUOS DE TETRACICLINAS EN OTROS TEJIDOS.....	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
3.1. LUGAR DE ESTUDIO.....	44
3.2. ANIMALES EXPERIMENTALES.....	44
3.3. TRATAMIENTOS.....	45
3.4. INSTALACIONES Y EQUIPOS DE CRIANZA.....	45
3.5. ALIMENTACIÓN.....	46
3.6. EQUIPAMIENTO Y MATERIAL DE LABORATORIO.....	46
3.6.1. Equipos.....	46
3.6.2. Materiales.....	46
3.7. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.....	47
3.8. MÉTODO.....	47
3.8.1. Preparación del Agar Mueller Hinton.....	48
3.8.2. Preparación del estándar (Mc Farland) para el inóculo.....	49
3.8.2.1. Preparación del Estándar de Turbidez.....	49
3.8.3. Preparación del Inóculo (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633).....	49
3.8.3.1. Método de Desarrollo Previo.....	49
3.8.4. Preparación de la Muestra.....	50
3.8.5. Inoculación de las Placas.....	51
3.8.6. Aplicación de los Discos Control.....	52
3.8.7. Incubación.....	52
3.8.8. Lectura de las Placas e Interpretación de los Resultados.....	52
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53
IV. RESULTADOS.....	54
V. DISCUSIÓN.....	61

VI. CONCLUSIONES.....	65
VII. RECOMENDACIONES.....	66
VIII. LITERATURA CITADA.....	67
IX. APENDICE.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC:	Colección Americana de Cultivos Tipo
BR Test:	Prueba de reducción negro brillante
CAST:	Prueba para antibióticos y sulfamidas en terneros
CE:	Comisión Europea
CFT:	Prueba Charm Farm
CTC:	Clortetraciclina
CVMP:	Comité Veterinario Europeo para productos medicinales
DXC:	Doxiciclina
ELISA:	Ensayo Inmuno absorbente ligado a enzimas
FPT:	Método de las cuatro placas
FS:	Factor de Seguridad
GC:	Cromatografía a Gas
HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
IDA:	Ingestión Diaria Admisible
IG:	Inmunoglobulina
IM:	Intramuscular
IV:	Intravenoso
LC:	Cromatografía Líquida
LMR:	Límite Máximo de Residuos
LOD:	Límite de Detección
MNC:	Minociclina
MS:	Espectrometría de Masa
NOEL:	Nivel Sin Efectos Adversos Observables
OTC:	Oxitetraciclina
RDI:	Ingesta Diaria Recomendada
RIA:	Radioinmunoensayo
RNA:	Acido Ribonucleico
RNA_m:	Acido Ribonucleico Mensajero
RNA_t:	Acido Ribonucleico de Transferencia
RTC:	Rolitetraciclina
SPFIA:	Inmunoensayo fluorescente en fase sólida con formato competitivo

STOP: Prueba in situ con torundas

TC: Tetraciclina

TLC: Cromatografía de capa fina

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

UV: Ultravioleta

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto combinado de dosis y formas de dosificación sobre la presencia de residuos de oxitetraciclina en huevos durante el periodo de administración. También se buscó determinar la persistencia de estos residuos durante el periodo de supresión. Se utilizaron 20 gallinas de postura comercial de 50 semanas de edad, divididas aleatoriamente en cinco tratamientos de cuatro repeticiones cada uno, a las cuales se le suministró oxitetraciclina por 7 días. Los tratamientos durante el experimento fueron como sigue: Tratamiento A: Oxitetraciclina en dosis profiláctica (118 g/1000 L) vía agua de bebida; Tratamiento B: Oxitetraciclina en dosis terapéutica (156 g/1000 L) vía agua de bebida; Tratamiento C: Oxitetraciclina en dosis profiláctica (200 g/t) vía alimento; Tratamiento D: Oxitetraciclina en dosis terapéutica (156 g/1000L y 300 g/t) vía agua de bebida y alimento, respectivamente; Tratamiento E: Agua y alimento libres de oxitetraciclina, como grupo control. Las aves contaron con alimento y agua *ad libitum* así como 14 horas de luz diaria. Posteriormente se evaluó la presencia residual de antibióticos en los huevos por puesta diaria durante el periodo de administración y por los próximos 14 días, haciendo uso de una prueba microbiológica de difusión agar. Se observó diferencia estadística significativa entre tratamientos en términos de halo de inhibición ($p < 0,05$) a partir del 3er y 4to día de dosificación. Este efecto se prolongó hasta el 3er y 4to día del periodo de retiro, donde el Tratamiento D presentó residuos con el mayor tamaño de halo de inhibición, además de mostrar niveles residuales en un menor tiempo y con una mayor persistencia en comparación a los otros tratamientos.

Palabras claves: Gallinas de postura, periodo de retiro, profiláctico, residuos de oxitetraciclina, terapéutico.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of combined doses and ways of dosage for the presence of oxytetracycline residues in eggs during the dosage period. It also looked determined the persistence of these residues during the withdrawal period. Twenty commercial laying hens of 50 weeks of age were used. They were randomly divided in 5 treatments of 4 repetitions each one, and supplemented with oxytetracycline for 7 days. The treatments were: A: Oxytetracycline, at prophylactic dose (118 g/1000 L), by drinking water; B: Oxytetracycline, at therapeutic dose (156 g/1000 L), by drinking water; C: Oxytetracycline, at prophylactic dose (200 g/t), by feed; D: Oxytetracycline, at therapeutic dose (156 g/1000L y 300 g/t), by drinking water and feed respectively; E: Water and feed free of oxytetracycline as a control group. The laying hens had water and feed *ad libitum*, as well as, 14 hours of daily light. Afterwards, the presence of antibiotic residues in eggs was daily evaluated during the dosage period and for the next 14 days using a microbiological agar diffusion assay. Statistically significant difference was founded among treatments in terms of inhibition halo ($p < 0.05$) in the 3th and 4th dosage day. This effect was extended until the 3th and 4th day of withdrawal period, in which the treatment D had the biggest inhibition halo. It also showed oxytetracycline residue levels in less time and for a longer period than the other treatments.

Key Words: Laying hens, withdrawal period, prophylactic, oxytetracycline residues, therapeutic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte esquemático de un huevo para mostrar su estructura.....	5
Figura 2. Mecanismo y blanco de acción de los antibióticos.....	11
Figura 3. Estructura química de las tetraciclinas.....	15
Figura 4. Inhibición de la síntesis proteica bacteriana por parte de las Tetraciclinas.....	16
Figura 5. Mecanismos de transferencias de resistencias a antibióticos.....	26
Figura 6. Determinación del tamaño del halo de inhibición formado alrededor de una muestra.....	34
Figura 7. Distribución de las gallinas en tratamientos.....	45
Figura 8. Cepa de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	47
Figura 9. Placas de agar Mueller Hinton.....	48
Figura 10. Obtención de la muestra lista para ser inoculada.....	50
Figura 11. Sembrado del <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 sobre la superficie del agar.....	51
Figura 12. Muestra colocada en el agar sembrado previamente con el inóculo.....	52
Figura 13. Halo de inhibición de 10 mm observada en el tratamiento D.....	56
Figura 14. Ausencia de halo de inhibición en el tratamiento control.....	56
Figura 15. Patrón de distribución de residuos de oxitetraciclina en la muestras...	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química media del huevo.....	4
Cuadro 2. LMR de oxitetraciclina fijado para todas las especies productoras de alimentos, en diferentes tejidos.Reglamento (CE) n° 1570/98.....	28
Cuadro 3. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el periodo de Pre – dosificación.....	57
Cuadro 4. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 1er y 2do día de dosificación.....	57
Cuadro 5. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 3er y 4to día de dosificación.....	57
Cuadro 6. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 5to, 6to y 7mo día de dosificación.....	58
Cuadro 7. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 1er y 2do día de retiro.....	58
Cuadro 8. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 3er y 4to día de retiro.....	58
Cuadro 9. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 5to y 6to día de retiro.....	59
Cuadro 10. Número de muestras examinadas para la presencia..... de residuos de oxitetraciclina	59

I. INTRODUCCION

Como resultado de la constante preocupación por prevenir la difusión y/o persistencia de las enfermedades infecciosas dentro de la granja, se ha tratado de dar uso a la tecnología más avanzada en la crianza de las aves. Pese a esta medida, la impresionante magnitud que actualmente alcanza la población avícola mundial, ha creado complejas situaciones de carácter sanitario al tener que afrontar el desafío de multiplicidad de enfermedades tipo bacterianas, virales, fúngicas, entre otras, que hace algunas décadas no tuvieron la significación de nuestros días.

Este panorama ha dado lugar a la búsqueda de soluciones con el fin de prevenir las enfermedades, con apoyo de productos biológicos y, otras veces, a tratarlas mediante el camino de la terapia antibiótica. Esta última medida, sin embargo, no siempre se conduce con criterio científico debido a que, como reacción a la inminencia de una expansión del problema infeccioso, se recurre a los llamados tratamientos preventivos dentro de los cuales unas veces se utilizan antibióticos en dosis subterapéuticas, durante periodos más o menos prolongados, o en otras ocasiones se emplean dosis terapéuticas programadas periódicamente, como es el caso de la micoplasmosis, por ejemplo (Ilender, 1999), las cuales son administradas principalmente por vía oral debido al requerimiento de terapia masiva o de poblaciones necesitadas en este tipo de industria y en donde la oxitetraciclina representa uno de los antibióticos de elección.

Como consecuencia, existe el riesgo de que los residuos de antibióticos y/o sus metabolitos persistan en las aves y en los huevos obtenidos a partir de ellas, llegando a la cadena de alimentación humana. Esto tiene importantes repercusiones en la calidad

de los alimentos y sobre todo en la salud pública. Aunque los problemas de toxicidad aguda son poco probables, pueden llegarse a producirse reacciones alérgicas en individuos sensibles (Paige *et al.*, 1997). Igualmente hay que considerar la presión que ejercen estos residuos sobre la flora intestinal, favoreciendo la proliferación de microorganismos con resistencia natural o adquirida (OMS, 1993).

Si bien existen diversos métodos físico – químicos para la cuantificación de residuos de antibióticos en alimentos, son preferibles como control de rutina las técnicas microbiológicas de tipo cualitativo, las cuales no pretenden más que indicar la presencia o ausencia de algún inhibidor bacteriano. Éstas se presentan mucho más eficaces en términos de costo y rapidez (Myllyniemi, 2004).

Por todo lo anterior, el presente estudio buscó evaluar el efecto combinado de dosis y formas de dosificación sobre la presencia de residuos de oxitetraciclina en huevos durante su administración y retiro, haciendo uso de una prueba microbiológica de difusión agar.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. EL HUEVO

El huevo fue probablemente uno de los primeros ingredientes multifuncionales. Entre sus propiedades destacan su capacidad espumante, coagulante y emulsionante (Davis y Reeves, 2002). Así mismo, constituye una fuente importante de baja calorías, proteínas de alta calidad y varios nutrientes importantes, incluyendo la riboflavina (15% RDI), el selenio (17% RDI) y la vitamina K (31% RDI) (Anon, 1989).

Un huevo contiene en promedio 6 gr. de proteína de excelente calidad (el mismo que puede ser encontrado en 35 gr. de queso Cottage o 180 ml. de leche) así como también ácido fólico, vitaminas A, B, D y E y hierro (Burrington, 2000). Además, un huevo contiene aproximadamente 2000 mg. de colina, el cual ha sido asociado con el desarrollo temprano del cerebro.

El huevo constituye también una fuente importante de luteína y zeaxantina, con una yema que provee de carotenoides antioxidantes, los cuales han sido asociado con un menor riesgo de edad para la degeneración macular, una causa mayor de ceguera (Hasler, 2000).

En el cuadro 1. Se puede apreciar la composición química de la parte comestible del huevo (clara y yema) (Falder, 2005).

Cuadro 1. Composición química media del huevo (Falder, 2005)

Agua	75,2%
Hidratos de Carbono	0,6% (Fibra 0%)
Lípidos	12,1%
Ácidos Grasos Saturados	3,3%
Ácidos Grasos Monoinsaturados	4,9%
Ácidos Grasos Poliinsaturados	1,8%
Colesterol	0,4%
Proteínas	12,5%
Sodio	97 mg/100 g
Potasio	124 mg/100 g
Calcio	56 mg/100 g
Magnesio	12 mg/100 g
Hierro	2 mg/100 g
Yodo	13 microgramos/100 g
Vitamina B1 (Tiamina)	0,1 mg/100 g
Vitamina B2 (Riboflavina)	0,3 mg/100 g
Niacina (Acido Nicotínico)	0,1 mg/100 g
Ácido Fólico	0,05 mg/100 g
Vitamina B6 (Piridoxina)	0,1 mg/100 g
Vitamina A	0,2 mg/100gr (equivalentes retinol)
Vitamina D	2 microgramos/100 g
Vitamina E	2 mg/100 g

2.1.1. Estructura del Huevo

A simple vista, el corte transversal de un huevo de gallina permite diferenciar nítidamente las partes fundamentales de su estructura: la cáscara, la clara y la yema (Figura 1), separadas entre sí por medio de membranas que mantienen su integridad (Davis y Reeves, 2002).

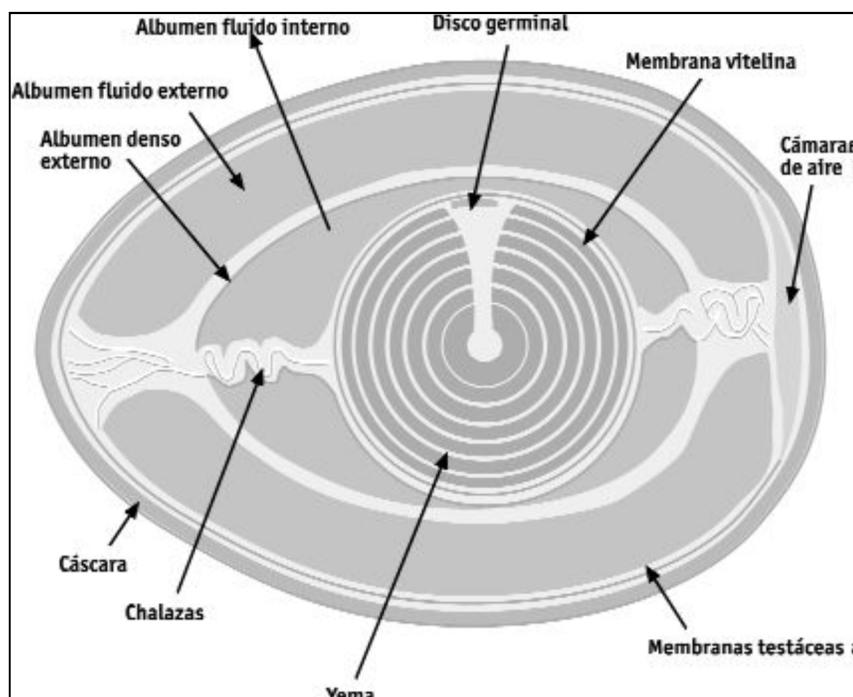


Figura 1. Corte esquemático de un huevo para mostrar su estructura. (Tomado del Instituto de Estudios del Huevo. 2004).

2.1.1.1. La Cáscara

La compleja microarquitectura de la cáscara aviar es el resultado final de la interacción de cristales de carbonato de calcio con moléculas de matriz orgánica (Nys *et al.*, 1999).

La cáscara supone el 11.5% del peso del huevo. De fuera a dentro, la cáscara se compone de varias capas: a) Cutícula (permeable a los gases), b) Capa de carbonato cálcico (que representa la mayor parte de la cáscara), c) Membranas, con dos capas, una la externa más gruesa y otra la interna más fina, que es la que separa la cáscara del albumen (Falder, 2005).

El color de la cáscara es un carácter estrechamente unido a la herencia y depende de la concentración de unos pigmentos denominados porfirinas depositados en la matriz cálcica. La raza de la gallina determina el color de la cáscara del huevo, blanco o de color (también llamado “moreno”), sin que haya diferencias de calidad nutricional entre

ambos. Como sucede con la resistencia de la cáscara, la coloración disminuye al aumentar la edad de la gallina (Instituto de Estudios del Huevo e INPROVO, 2002).

2.1.1.2. La Clara o Albumen

Aproximadamente, la clara supone el 57% del peso del huevo de gallina. En la clara de fuera a dentro se distinguen: La capa delgada externa, la capa espesa, la capa delgada interna y la chalaza (Falder, 2005).

La clara o albumen está compuesta básicamente por agua (88%) y proteínas (cerca del 12%). La proteína más importante (54% del total proteico) es la ovoalbúmina, cuyas propiedades son de interés especial tanto desde el punto de vista nutritivo como desde el culinario (Instituto de Estudios del Huevo e INPROVO, 2002).

La glucosa (en 0.5%) cuenta con cerca del 98% del total de carbohidratos libres. La cantidad de lípidos en la clara es insignificante (0.01%) comparada con la cantidad presente en la yema (4%) (Powrie y Nakai, 1986).

En la cocina, la ovoalbúmina es particularmente interesante para la elaboración de muchos platos debido a la estructura gelatinosa que adquiere cuando se somete a la acción del calor. En la clara se encuentran algo más de la mitad de las proteínas del huevo y ningún lípido. Las vitaminas B2 y niacina están en mayor cantidad en la clara que en la yema (Instituto de Estudios del Huevo e INPROVO, 2002).

2.1.1.3. La Yema

La yema supone el 31.2% del peso total del huevo. Sus principales componentes son: la membrana vitelina, el disco embrionario, la estructura cónica, la latebra, las capas amarillas intensas y amarillas pálidas (Falder, 2005).

Contrario a la clara, la yema es más rica en lípidos que en proteínas. La yema contiene 15.7-16.6% de proteínas, 31.8-35.5% de lípidos, 0.2-1.0% de carbohidratos y 1.1% de cenizas en agua (Powrie y Nakai, 1986).

2.1.1.3.1. Lípidos de la yema

Los lípidos son los principales componentes de la yema, comprenden cerca del 60% de la yema estimada en peso seco. Entre los lípidos se incluyen triglicéridos, fosfolípidos, cerebrósidos, colesterol y algunos otros lípidos menores. Los mayores ácidos grasos encontrados son el oleico, palmítico, linoleico y ácido esteárico (Gibson *et al.*, 1998).

2.1.1.3.2. Proteínas de la yema

La yema es un fluido emulsificado homogéneamente. La mayor porción de la yema se encuentra en forma de lipoproteínas, las cuales son separadas en una fracción plasmática y una fracción granular (Awade, 1996).

2.1.1.3.3. Minerales de la yema

Destaca la presencia de fósforo, hierro, selenio, yodo y zinc en cantidades importantes respecto a las necesidades estimadas de estos oligoelementos. (Instituto de Estudios del Huevo e INPROVO, 2002).

2.1.1.3.4. Carbohidratos de la yema

El contenido de carbohidratos en la yema es cerca del 1%. La mayoría de este material (70%) son oligosacáridos (principalmente glucosamina y manosa) y se encuentran unidos a proteínas. El 30% restante son carbohidratos libres en la forma de glucosa (Sungino *et al.*, 1997).

2.1.1.3.5. Pigmentos de la yema

La yema es la porción del huevo más rica en pigmentos, sin embargo la cantidad es 0.02% basada en el peso seco. Los pigmentos de la yema incluyen carotenos y riboflavina. Los carotenos, los cuales son responsables del color de la yema, no pueden

ser sintetizados por las aves. El alimento de las aves es el responsable por el contenido de carotenos y el color de la yema (Sungino *et al.*, 1997).

2.1.2. El huevo en la Alimentación

Los distintos compuestos presentes en el huevo cumplen, además de las funciones nutritivas ya citadas, otras no menos importantes para la salud.

Entre ellas es de destacar la acción antioxidante de algunas vitaminas y oligoelementos del huevo que ayuda a proteger a nuestro organismo de procesos degenerativos diversos (cáncer, diabetes, cataratas), así como de las enfermedades cardiovasculares

Entre las sustancias “no nutritivas” presentes en el huevo se encuentran diversos anticuerpos cuya acción más significativa es la de favorecer, estimular o mantener la respuesta inmune del organismo frente a determinados procesos infecciosos (Instituto de Estudios del Huevo e INPROVO, 2002).

2.1.3. Los Ovoproductos

La legislación vigente de la Unión Europea (Real Decreto 640/2006) define a los ovoproductos como los productos obtenidos a partir del huevo de sus diferentes componentes o sus mezclas, una vez quitadas la cáscara y las membranas y que están destinados al consumo humano; podrán estar parcialmente completados por otros productos alimenticios o aditivos; podrán hallarse en estado líquido, concentrado, desecado, cristalizado, congelado, ultracongelado o coagulado. A nivel técnico también se pueden considerar como ovoproductos los destinados a distintas aplicaciones industriales no alimentarias y los componentes extraídos de yema o clara, como la lecitina o la lisozima.

2.2. LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos), o sintetizados por métodos de laboratorio, cuya función es inhibir el crecimiento o destruir a otros microorganismos (Sande y Mandell, 1982).

Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano. Se han utilizado de manera indistinta los términos antibiótico, antimicrobiano y quimioterapéutico para designar sustancias químicas definidas con actividad contra microorganismos específicos (Cordiés y Vásquez, 1990).

Los agentes quimioterapéuticos son sustancias con actividad antimicrobiana, de toxicidad suficientemente baja como para poder ser administrados a un organismo por la vía adecuada, hasta alcanzar y mantener concentraciones eficaces en los tejidos (Lanosa, 1997).

2.2.1. Clasificación de los Antibióticos

Existen muchas formas de clasificar a los antibióticos. Entre las principales tenemos:

2.2.1.1. Según el Mecanismo de Acción en la Bacteria (Figura 2)

2.2.1.1.1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana tiene habitualmente un efecto bactericida (Sande y Mandell, 1982). La estructura de la pared celular es un polímero denominado peptidoglicano, cuya síntesis se divide en 3 etapas principales, cada una de éstas es inhibida por un grupo de antibióticos diferentes.

En la primera etapa se forma el UDP-N-acetilmunamil - pentapéptido en el citoplasma bacteriano. En la segunda etapa, se polimerizan el UDP-N-acetilmuramil -

pentapéptido y la N-acetilglucosamina que son transportados a través de la membrana citoplasmática y se unen al punto de crecimiento de la pared bacteriana. Esta fase es inhibida por antibióticos como la vancomicina y la bacitracina (Calderwood y Moellering, 1988). Por último, las cadenas de peptidoglucano, una vez fuera de la célula, quedan entrelazadas transversalmente y dan lugar a la formación de un polímero tridimensional, esta etapa, también conocida como reacción de transpeptidación es inhibida por las penicilinas y las cefalosporinas (Neu, 1987).

2.2.1.1.2. Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad

La membrana citoplasmática es fundamental para la regulación del medio intracelular de la bacteria (Calderwood y Moellering, 1988). Esta membrana tiene estructuras diferentes para las bacterias y los hongos y puede lesionarse por algunos antibióticos como la polimixina, pristanamicina y anfotericina B.

2.2.1.1.3. Antibióticos que inhiben la síntesis proteica

Algunos antibióticos (cloramfenicol, lincomicina, aminoglucósidos y las tetraciclinas) son capaces de inhibir la síntesis de las proteínas en las bacterias (Broek, 1989). El ribosoma bacteriano más pequeño que el de los mamíferos, consta de 2 subunidades denominadas 50s y 30s; el antibiótico se une a los ribosomas bacterianos y bloquean la acción del RNA mensajero, este bloqueo en ocasiones es reversible (Taylor y Reide, 2001).

2.2.1.1.4. Antibióticos que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos

Las fluoroquinolonas, sulfonamidas, rifampicina, novobiocina y los nitroimidazoles actúan por este mecanismo al inhibir de forma selectiva, la enzima RNA polimerasa dependiente del DNA, lo cual cataliza la transcripción de la información genética contenida en el RNA mensajero y se convierte así en un potente bactericida (Greenwood, 1992).

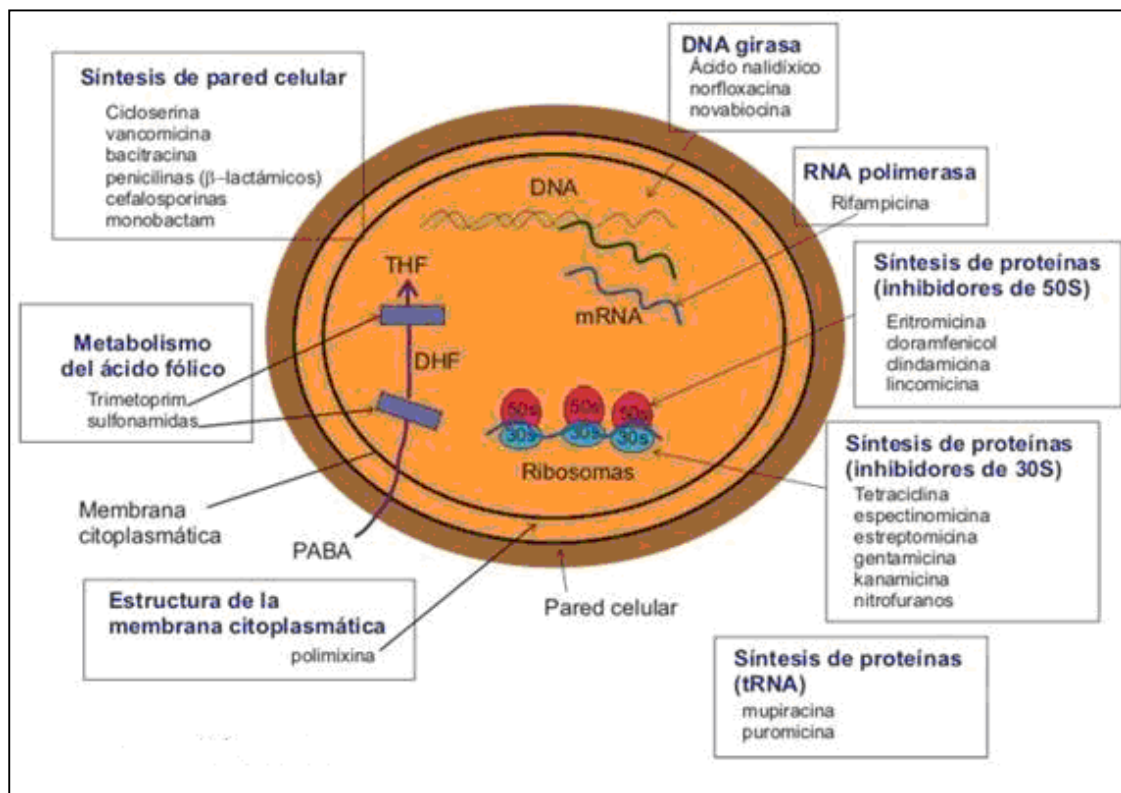


Figura 2. Mecanismo y blanco de acción de los antibióticos. (Tomado de Brock *et al.*, 1999.)

2.2.1.2. Según si eliminan las bacterias o inhiben el crecimiento de las mismas

2.2.1.2.1. Bactericidas

Son aquellos antibióticos capaces de producir muerte en las bacterias. Por ejemplo: Los aminoglucósidos.

2.2.1.2.2. Bacteriostáticos

Son aquellos antibióticos que inhiben el crecimiento y multiplicación celular. Son el caso de las tetraciclinas y las sulfonamidas (Taylor y Reide, 2001).

2.2.1.3. Según su Espectro de Acción

2.2.1.3.1. Antibióticos de Amplio Espectro

Son aquellos antimicrobianos capaces de actuar sobre ambas bacterias (gram positivas y gram negativas). Por ejemplo: Las tetraciclinas.

2.2.1.3.2. Antibióticos de Espectro Reducido

Son aquellos que actúan solo sobre un grupo de organismos, llegando a veces a tener un espectro de acción sumamente limitado; siendo tóxico tan solo para una especie bacteriana o para muy pocas especies. Por ejemplo: las penicilinas, actúan frente a una multitud de bacterias gram positivas. Los aminoglucósidos, son eficaces frente a bacterias gram negativas (Pérez, 2005).

2.2.1.4. Según sus fines de utilización

2.2.1.4.1. Fines Profilácticos

Se utiliza solamente en aquellos casos en que esté demostrado su importancia para prevenir una infección al realizar un procedimiento determinado y mientras dure éste; por ejemplo, en los ciclos iniciales de crecimiento de animales, especialmente sensibles a agentes infecciosos muy particulares.

2.2.1.4.2. Fines Terapéuticos

Se aplica como tratamiento de una infección documentada. Esta es la forma ideal de tratamiento antimicrobiano, conociendo el agente causal.

Muchas veces el tratamiento se comienza de forma empírica en casos de sospecha de infección cuando se considera urgente la necesidad del mismo. Siempre que sea posible es importante realizar cultivos pertinentes previos, antes de instaurar el tratamiento, para

poder valorar a posteriori la eficacia de los antibióticos utilizados (Cancho Grande *et al.*, 2000).

2.2.2. Vías de Administración de los Antibióticos

La vía de administración preferida por los profesionales varía en función de la especie animal, aunque cabe destacar que la alimentación es una de las más usadas a la hora de medicar en los sectores zootécnicos (Cancho Grande *et al.*, 2000).

2.2.2.1. Vía Oral

De elección debido a su fácil manejo y dosificación, además de ser menos traumático e indoloro. En el caso de las aves se hace uso mayormente de esta vía, debido al requerimiento de terapia masiva o de poblaciones necesitadas en este tipo de industria (Ilender, 1999).

2.2.2.1.1. Medicación en el Agua de Bebida

La administración vía agua de bebida es a menudo preferible en la instauración de tratamientos aviares debido a que no presenta la limitación de falta de apetito en aves enfermas. Sin embargo, la cantidad de fluido ingerido por las aves podría variar debido a alteraciones en el clima, a la facilidad de acceso, a la higiene del agua, o a la palatabilidad del agua medicada (Residue Guideline, 2004).

2.2.2.1.2. Medicación en el Alimento

Los alimentos medicados son incorporados generalmente en forma de pellets o en polvo y son comúnmente usados en la medicación masal de las aves, particularmente cuando la propiedades fisicoquímicas de las droga hacen insoluble su presencia en el agua. Variaciones en el consumo de alimentos son asociados al clima, cambios en el galpón, raza, tipo, variedad y edad del ave, peso, tasa de puesta, energía, contenido de fibra, y tamaño de la partícula de los ingredientes (Residue Guideline, 2004).

2.2.2.2. Vía Parenteral

Su utilidad se ve relegada debido a la gran cantidad de mano de obra que se requiere, al stress el cual puede agravar los cuadros de enfermedad, además de las lesiones que se generan en el área de dosificación. Sin embargo su uso se ve justificada si se trata de animales valiosos como aquellos de exposición o de competición (gallos de pelea, por ejemplo) en donde si se hace viable la utilización de un tratamiento individual (Gómez *et al.*, 1991).

2.3. LAS TETRACICLINAS

2.3.1. Origen

A finales de los años cuarenta, y como resultado de la necesidad de nuevos y potentes antibióticos, se desarrollaron las primeras tetraciclinas obtenidas a partir de microorganismos (*Streptomyces*) presentes en muestras de suelos recogidos en diferentes partes del mundo (Franfe y Neu, 1987).

En 1948 es donde aparece el primero de estos compuestos, la clortetraciclina, y se da a conocer 2 años más tarde la oxitetraciclina. A partir de este momento, e ininterrumpidamente, se logra como consecuencia de los avances en el terreno de la bioquímica, la síntesis de nuevas tetraciclinas, en el orden siguiente: tetraciclina, 1952; democlociclina, 1957; metaciclina, 1961; doxiciclina, 1966; minociclina, 1972 y limeciclina, 1976 (Rodríguez *et al.*, 1998).

2.3.2. Estructuras y Características Fisicoquímicas

La estructura química de estos antibióticos es tetracíclica, de ahí su denominación. El núcleo central está constituido por un tetraciclo u octahidronaftaceno, con una función carboxamida (Figura 3) (Escolar *et al.*, 1998).

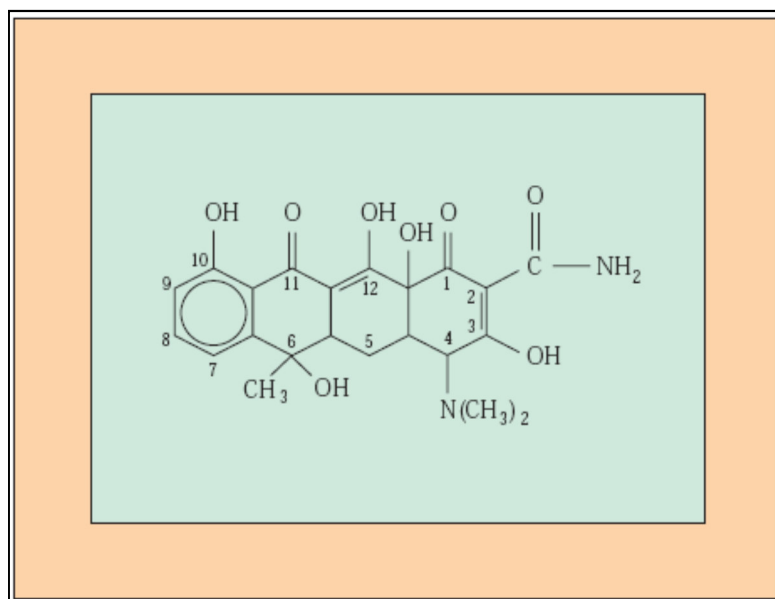


Figura 3. Estructura química de las tetraciclinas (Tomado de Escolar *et al.*, 1998)

Las tetraciclinas son sustancias cristalinas ligeramente amarillas, sin olor y levemente amargas, son anfóteras ya que en solución acuosa forman sales tanto con ácidos como bases. Son estables en forma de polvo pero no en solución acuosa, siendo particularmente inestables a pH superiores a 7.0. Se destruyen con soluciones ácidas de pH inferiores a 2.

En pH ácido se disuelven poco, pero pueden combinarse con sodio o clorhidrato, lo que las hace más solubles. En solución acuosa neutra, la clortetraciclina pierde la mayor parte de su actividad en un día, la oxitetraciclina en tres o cuatro días y la tetraciclina en unas tres semanas (El Korchi, 2006).

2.3.3. Mecanismo de Acción

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse reversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Figura 4), de esta forma bloquean la unión del complejo aminoacil-ARN-transferasa de la subunidad 50S al *locus* A, que actúa como aceptor (Escolar *et al.*, 1998).

Son antibióticos de actividad primariamente bacteriostática (Taylor y Reide, 2001), aunque a concentraciones elevadas y frente a bacterias muy sensibles pueden comportarse como bactericidas.

Al menos se requieren dos procesos para que puedan acceder al ribosoma bacteriano de los gram negativos: difusión pasiva a través de los canales hidrofóbicos formados por las purinas de la pared externa de la bacteria, y transporte activo asociado a algún sistema transportador. El mecanismo de penetración en las bacterias gram positivas, aunque menos conocido, parece producirse a través de un sistema dependiente de energía (El Korchí, 2006).

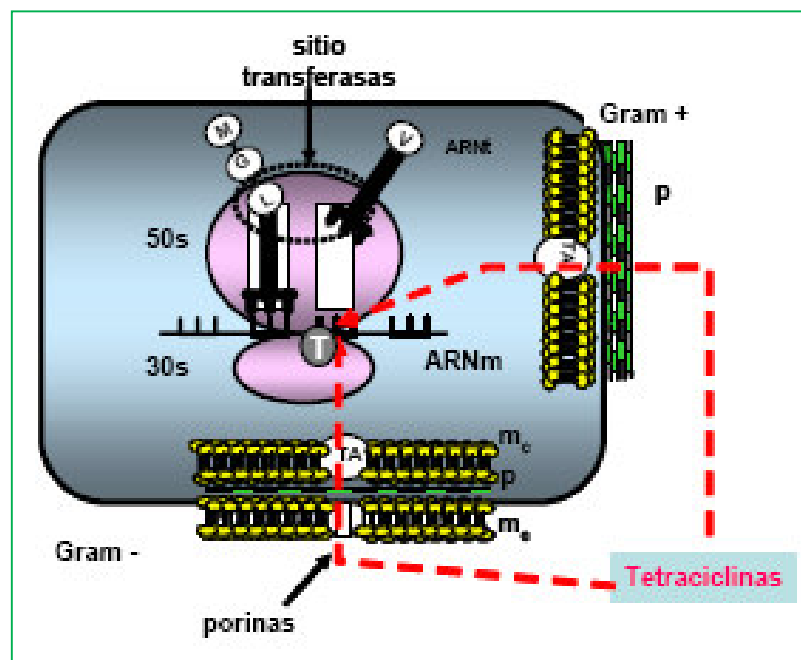


Figura 4. Inhibición de la síntesis proteica bacteriana por parte de las tetraciclinas (Tomado de El Korchí, 2006).

2.3.4. Espectro Antimicrobiano

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro, activos frente a cocos gram positivos y gram negativos aerobios y anaerobios, bacilos gram positivos y bacilos gram negativos, además de gérmenes de crecimiento intracelular obligado. En general, los

gram positivos suelen ser sensibles a concentraciones más bajas que los gram negativos (Escolar *et al.*, 1998).

2.3.5. Resistencia Antibacteriana

Es ciertamente evidente la pérdida de susceptibilidad a las tetraciclinas por su uso indiscriminado. Por la aparición de cepas resistentes, las tetraciclinas han perdido parte de su utilidad inicial. *Proteus spp.* y *Pseudomonas spp.* con frecuencia son resistentes. Entre las bacterias *Coliformes*, *Bacteroides*, *Pneumococos*, *Stafilococos*, *Streptococo*, *Shigella spp.* y *Vibriones*, cada vez son más comunes las cepas resistentes a las tetraciclinas (Rodríguez *et al.*, 1998). Esta resistencia parece estar mediada por plásmidos y es inducible (El Korchi, 2006).

2.3.6. Farmacocinética

En términos generales, la absorción oral de las tetraciclinas es buena, aunque variable de unas a otras en función de su liposolubilidad. Es baja para clortetraciclina, intermedia para demeclociclina, oxitetraciclina y tetraciclina, y elevada para doxiciclina y minociclina, presentando estos últimos una biodisponibilidad próxima al 100% (Escolar *et al.*, 1998).

2.3.6.1. Absorción

Generalmente, todas las tetraciclinas se absorben en el tracto gastrointestinal, fundamentalmente a nivel del estómago e intestino delgado superior, la absorción es menos completa a nivel del tracto intestinal inferior. La absorción aumenta en ayunas y se deteriora si se administra con leche u otros productos lácteos, geles de hidróxido de aluminio y magnesio, quelantes con cationes divalentes de calcio y hierro, y bicarbonato de sodio, posiblemente en relación con el pH gástrico (Rodríguez *et al.*, 1998).

Las tetraciclinas se depositan especialmente en tejidos calcificados como hueso y dientes, y en tejidos con inflamación crónica necrosante en los que su depósito origina una pigmentación amarillenta característica (LeBlanc y Perry, 1967).

Por vía intramuscular la oxitetraciclina y la tetraciclina se absorben bastante bien y se detectan en plasma a los 15 minutos, alcanzando su máximo valor en 1 hora, mientras que por vía oral la concentración plasmática máxima se alcanza entre 1 y 3 horas (El Korchi, 2006).

2.3.6.2. Distribución

Las tetraciclinas se distribuyen de forma rápida y difunden bien por todos los tejidos y líquidos corporales. Se unen a las proteínas plasmáticas en un grado variable, así la doxiciclina se une a proteínas entre un 80 y un 95%, la demeclociclina entre el 65 y 90%, la metaciclina alrededor de un 80% , la minociclina alrededor de un 95%, la tetraciclina en 65% y la oxitetraciclina entre el 20 y el 40% (Merle *et al.*, 1991).

Debido a su capacidad de formar quelatos, las tetraciclinas tienen tendencia a depositarse en huesos y dientes, siendo tanto más evidente este efecto cuando mayor sea la duración del tratamiento (Grossman *et al.*, 1971) y mayor la capacidad individual de cada tetraciclina para formar complejos más o menos estables.

2.3.6.3. Metabolismo

Las tetraciclinas se metabolizan en el hígado en diferentes proporciones y de acuerdo con el tipo de tetraciclina de que se trate. Sin embargo, en la mayor parte de los casos el compuesto detectado con más frecuencia en heces, orina y tejidos es la tetraciclina original, y el grado de biotransformación es mínimo (El Korchi, 2006).

2.3.6.4. Eliminación

Las tetraciclinas se excretan por orina, bilis, lágrimas, saliva y leche, principalmente de forma activa. La principal vía de eliminación es la renal mediante filtración glomerular. Otra vía de eliminación es la bilio-fecal. En el hígado se metabolizan mediante glucuronización dando lugar a metabolitos inactivos que sufren circulación enterohepática, es decir, una vez que alcanzan el intestino con la bilis son reabsorbidas llegando nuevamente al hígado y a la bilis, por lo que volverán a alcanzar el intestino

donde una parte repetirá el ciclo y otra se eliminará con las heces. Esta última ruta de eliminación es la más empleada por la clortetraciclina (84%) y doxiciclina (94%), y en menor proporción por la minociclina (60%). El resto de las tetraciclinas se eliminan preferentemente por vía renal (Fabre *et al.*, 1971).

La vida media de eliminación es muy variable de unos componentes del grupo a otros, oscilando entre las 6 horas para la clortetraciclina, hasta 18 horas para la doxiciclina y minociclina (Escolar *et al.*, 1998).

En caso de insuficiencia renal se afecta significativamente la eliminación de las tetraciclinas hidrosolubles, mientras que la doxiciclina, clortetraciclina y minociclina no sufren modificación alguna en su aclaramiento, que sí disminuye en caso de insuficiencia hepática. Al circular unidos a proteínas plasmáticas en una alta proporción, las tetraciclinas son fármacos poco dializables (Whelton, 1978).

2.3.7. Interacciones Farmacológicas

Se ha señalado que existe sinergismo entre las tetraciclinas y la tilosina frente a *Pasteurella sp.* y es posible que este fenómeno se dé también entre las tetraciclinas y los demás macrólidos. Del mismo modo, su asociación con las polimixinas produce efectos sinérgicos, apreciándose un aumento de la captación de los antibióticos por parte de las bacterias (Bentley, 1983).

Las tetraciclinas no deben administrarse junto con penicilinas, ni cefalosporinas ya que, debido a su mecanismo de acción, las tetraciclinas pueden antagonizar el efecto de los antibióticos bactericidas especialmente de los b-lactámicos, puesto que la penicilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular y las tetraciclinas, que inhiben la síntesis de las proteínas, pueden enmascarar el efecto bactericida de la penicilina (El Korchi, 2006).

Fármacos como fenitoína, carbamacepina y barbitúricos inducen el metabolismo de la doxiciclina ocasionando una reducción en los niveles plasmáticos. Las tetraciclinas pueden incrementar los niveles plasmáticos de la digoxina y potenciar el efecto de los

bloqueantes neuromusculares. Las reacciones adversas de teofilina son más frecuentes en pacientes que están en tratamiento con estos antibióticos (Escolar *et al.*, 1998).

2.3.8. Reacciones Adversas

Las reacciones adversas de las tetraciclinas se pueden atribuir a su carácter extremadamente irritante, provocando vómitos tras su administración por vía oral y lesiones tisulares en el lugar donde se inyectan (Nouws y Vree, 1983).

También las tetraciclinas modifican la flora intestinal dando lugar a diarreas y trastornos gastrointestinales. Asimismo, son capaces de quelarse al calcio provocando efectos cardiovasculares, además forman depósitos en los dientes y en los huesos y presentan una ligera acción tóxica sobre las células renales y hepáticas (El Korchi, 2006).

Una de las reacciones adversas más frecuentes es la fotosensibilidad, fenómeno muy característico, de carácter leve, que cursa con eritema, edema, exfoliación, parestesias e hiperpigmentación después de la exposición solar. En este contexto se ha descrito onicólisis y pigmentación ungueal que pueden presentarse tres a cuatro días después de la exposición solar y siempre precedida de las lesiones cutáneas. El fármaco que presenta mayor riesgo de fotosensibilización es la demeclociclina, y las de menor riesgo son las de semivida de eliminación más prolongada (Frost *et al.*, 1972).

2.3.9. Toxicidad

En general los efectos tóxicos observados han tenido una relación directa con dosis elevadas y con una alta frecuencia de administración (El Korchi, 2006).

Ocasionalmente se han descrito alteraciones hepáticas severas de comienzo y evolución súbita como degeneración grasa del hígado, que pueden incluso llegar a provocar la muerte del paciente. Es más frecuente su aparición cuando se administran dosis elevadas de tetraciclinas por vía intravenosa (Escolar *et al.*, 1998).

Las tetraciclinas pueden agravar la uremia en animales con nefropatía mediante el bloqueo de la síntesis de proteínas. También inducen el metabolismo de los aminoácidos, provocando hiperazotemia (Shils, 1963).

2.3.10. Utilización Clínica

Las tetraciclinas son ampliamente utilizadas para la prevención y el tratamiento de un gran número de enfermedades infecciosas (respiratorias, renales, oculares, genitales, mastitis, etc.) producidas por gérmenes gram positivos, gram negativos, micoplasmas, rickettsias, clamideas, etc. Se utilizan en porcino, bovino, ovino, aves, perros, équidos, etc. y pueden administrarse con facilidad por diferentes vías (I.M., I.V., oral, mezcladas con el pienso o con el agua de bebida) (El Korchi, 2006).

La oxitetraciclina es de las tetraciclinas más antiguas que se han utilizado durante muchos años incorporado en el pienso de los animales para el control de las enfermedades infecciosas, por su bajo precio, por su amplia actividad antimicrobiana, por su facilidad de administración y eficacia. Su amplio, generalizado y muchas veces indiscriminado uso ha contribuido a que hayan aparecido resistencias en bacterias patógenas de importancia clínica, siendo este el motivo que en la actualidad su valor como antibiótico bacteriostático sea mucho menor. No obstante, su capacidad para alcanzar concentraciones eficaces en la mayoría de los tejidos, junto con su amplio espectro de actividad hace que la oxitetraciclina sea útil en el tratamiento de las infecciones mixtas.

La utilización clínica de las tetraciclinas presenta variaciones de acuerdo a cada especie así tenemos:

2.3.10.1. Aves

En aves la enfermedad respiratoria crónica producida por la infección por micoplasmas, así como las infecciones secundarias por otros microorganismos como *E.coli*, causan graves pérdidas económicas en la industria avícola. Dentro de su tratamiento las tetraciclinas constituyen un grupo de antibióticos de elección frente a

micoplasmas, aunque algunos autores han descrito que afectan del algún modo al sistema inmune (Stipkovits *et al.*, 2001).

Las tetraciclinas son uno de los fármacos que se utilizan para el tratamiento de la coriza infecciosa, el cual es una enfermedad respiratoria aguda en aves ocasionada por el *Avibacterium paragallinarum* (Calnek *et al.*, 1997).

Se han desarrollado fármacos terapéuticos y profilácticos razonablemente eficaces contra la pulorosis y tifoidea aviar. La clortetraciclina 200 mg/kg a razón de 5 días fue eficaz para reducir la morbilidad y mortalidad de la tifoidea aviar (Grausgruber y Kissling, 1964).

Dorsey y Harshfield (1959) descubrieron que la oxitetraciclina y clortetraciclina resultaron eficaces en la prevención de la mortalidad en cólera aviar experimental en una pequeña parvada de aves de postura; la mortalidad fue 80% en un grupo no tratado comparado con 12% en el grupo que recibió alimento que contenía oxitetraciclina a una concentración de 500 g/tn.

2.3.10.2. Bovinos

Se recomienda la utilización de OTC en el tratamiento de la anaplasmosis causada por un parásito de los glóbulos rojos, *Anaplasma marginalis* (El Korchi, 2006).

2.3.10.3. Caninos

El tratamiento de elección para la fase aguda de la Erlichiosis Monocítica Canina es la doxiciclina a una dosis de 10 mg/kg una vez por día (o 5 mg/kg dos veces por día) durante tres semanas como mínimo. Un tratamiento a corto plazo con doxiciclina (10 mg/kg, una sola toma diaria durante 7 días) no ha tenido buenos resultados, mientras que la administración durante 10 días fue exitosa (Warner y Harris, 2000).

2.3.10.4. Porcinos

La OTC suele emplearse tanto para prevenir como para tratar la rinitis atrófica y las enfermedades de las vías respiratorias bajas (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*) (El Korch, 2006).

2.4. EFECTO DE LOS RESIDUOS ANTIBIOTICOS SOBRE LA SALUD PÚBLICA

Se denomina residuos a los compuestos que permanecen en el organismo animal como consecuencia de un tratamiento, incluyendo el principio activo original y/o los productos de biotransformación (metabolitos). La presencia de estos residuos, en mayor o menor proporción, está relacionada con: la naturaleza del producto, la dosis utilizada, la forma de aplicación y el tiempo transcurrido desde su aplicación hasta la faena (en el caso de la carne y las vísceras) o hasta la recolección del producto (cuando se trata de leche y huevos) (Fernández Suárez, 2003).

2.4.1. Efectos Toxicológicos

Los efectos de los residuos no se manifiestan con un problema de toxicidad aguda, nadie se enfermará por consumir algunas veces un alimento animal con residuos de medicamentos. La manifestación es a largo plazo, por la ingestión de pequeñas cantidades de residuos en forma continua y por períodos prolongados (Pérez, 2005). Pueden englobarse en dos grandes grupos:

2.4.1.1. Efectos Directos

Son aquellos producidos por la utilización de antibióticos en condiciones terapéuticas. Se manifiestan dentro de amplias y por demás variadas formas clínicas: Toxicidad en riñón, hígado, sangre, médula, oído, efectos teratogénicos, carcinogénicos y alergias graves. No existe información sobre toxicidad por efecto directo por ingestión (Parra *et al.*, 2003).

2.4.1.2. Efectos Indirectos

Están representados por reacciones de hipersensibilidad y fenómenos de resistencia bacteriana (González Silvano, 1995):

2.4.1.2.1. Reacciones de Hipersensibilidad

Los antibióticos son haptenos, es decir, necesitan estar acoplados a una proteína para comportarse como antígenos capaces de inducir la formación de anticuerpos específicos. La sensibilización no suele depender de la dosis administrada. Los antibióticos que se eliminan sin sufrir transformación (por ejemplo, eritromicina, tetraciclinas), aparentan tener escaso poder antigénico. En cambio, los que se desdoblan parcialmente (por ejemplo, penicilinas, estreptomicina, sulfamidas), desempeñan, a menudo, el papel de alérgenos (Trolldenier, 1980).

Las reacciones inmunológicas podrían manifestarse desde reacciones anafilácticas con compromiso de la vida hasta reacciones menores, tal como erupciones. Las drogas inductoras de reacciones alérgicas pueden ser provocadas de forma aguda (dentro de los 60 minutos de exposición), subaguda (1-24 horas), o respuesta tardía (1 día a varias semanas) (Myllyniemi, 2004).

Los desordenes agudos y subagudos son a menudo producidos por reacciones de hipersensibilidad tipo 1, mediado por Ig E y en menor medida debido a Ig G (Hipersensibilidad tipo 2). Los desordenes producidos por inmunocomplejos (Hipersensibilidad tipo 3) son mucho más raros en este contexto. La hipersensibilidad Tipo 4 (mediada por células) desarrolla más tardíamente. Los tipos principales de desordenes son:

- a) Tipo 1:** Shock anafiláctico, Asma, y Edema angioneurótico.
- b) Tipo 2:** Anemia hemolítica, Agranulocitosis.
- c) Tipo 3:** Vasculitis alérgica, Enfermedad del suero.
- d) Tipo 4:** Dermatitis alérgica (Dayan, 1993; Riedl y Casillas, 2003).

A pesar de su naturaleza no toxica, los b-lactámicos aparecen como responsables de la mayoría de reportes humanos de reacciones alérgicas (Sundlof, 1994; Fein *et al.*, 1995). Los aminoglucósidos, sulfonamidas y tetraciclinas podrían también causar reacciones alérgicas (Paige *et al.*, 1997). Ciertos macrólidos podrían en casos excepcionales ser responsables por daños hepáticos, causados por una respuesta alérgica específica a metabolitos de macrólidos modificando células hepáticas (Dewdney *et al.*, 1991).

2.4.1.2.2. Resistencia Bacteriana

Existen fracasos en la terapia antimicrobiana, por razones de resistencia natural o adquirida. Se define como resistencia al conjunto de procesos mediante los cuales los microorganismos se vuelven inmunes a una droga antimicrobiana, pese a que inicialmente fueron sensibles a ella (Ilender, 2000).

El actual desarrollo de la terapia antibiótica nos da con frecuencia ejemplos de esta situación ya que año tras año se viene utilizando ingentes cantidades de estas drogas dentro de la actual tendencia a lograr una mayor producción (Gómez *et al.*, 1991).

2.4.1.2.2.1. Tipos de Resistencia

2.4.1.2.2.1.1. Natural o Intrínseca

Es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos, como lo demuestra el aislamiento de bacterias resistentes a los antimicrobianos, de una edad estimada de 2000 años encontradas en las profundidades de los glaciares de las regiones árticas de Canadá (Hart, 1998). Además, los microorganismos que producen antibióticos son por definición resistentes.

En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permiten tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Couvalin, 1988).

2.4.1.2.2.1.2. Adquirida

Se produce a partir de una mutación cromosómica o si la bacteria adquiere un plásmido de resistencia (Errecalde, 2004), es decir, un fragmento estracromosómico de DNA portador de genes que modifican la resistencia al antibiótico (Figura 5). La información genética presente en algunos plásmidos, es un factor importante en la patogenicidad o la invasividad de las bacterias, en la velocidad de aparición de cepas patógenas o invasivas resistentes a las drogas antimicrobianas y en la evolución del cuadro clínico (Cisneros y Gómez, 1987; Cordiés y Vásquez, 1990).

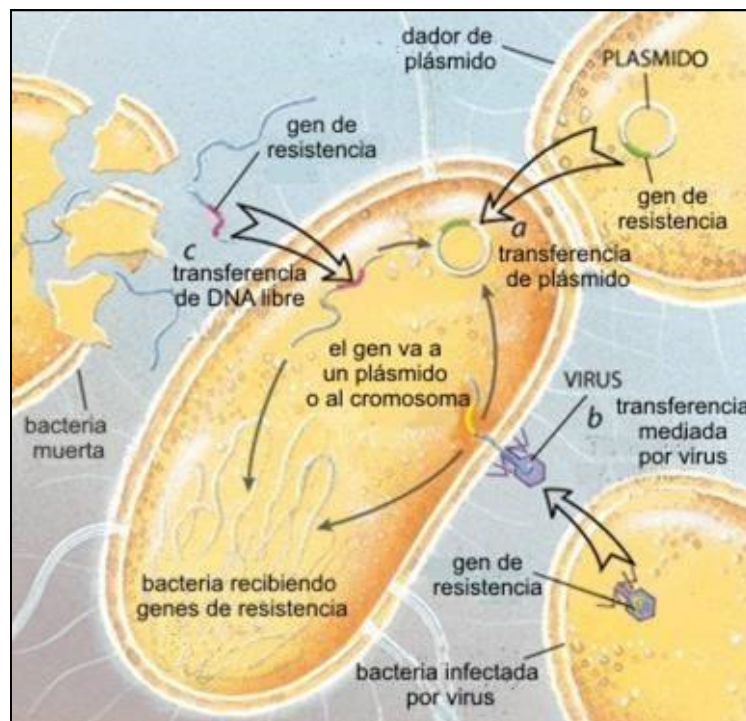


Figura 5. Mecanismos de transferencias de resistencias a antibióticos (Tomado de Levy, 1998).

2.4.2. Aspectos Toxicológicos

Para la evaluación del riesgo de los residuos de medicamentos animales se toman en cuenta los siguientes parámetros:

2.4.2.1. Nivel Sin Efectos Adversos Observables (NOEL): Corresponde a aquella dosis más baja, que en todos los estudios realizados, no haya dado lugar a

ninguna reacción adversa. Se escoge el valor inferior obtenido en la especie, y el test más sensible (El Korchi, 2006).

2.4.2.2. Ingestión Diaria Admisible (IDA): Es la cantidad diaria de un determinado residuo que puede ingerir el hombre durante su vida sin riesgo para la salud. Se calcula dividiendo el NOEL por un Factor de Seguridad (FS), que se fija arbitrariamente. Teniendo en cuenta el grado de certeza con los resultados toxicológicos pueden extrapolarse a los humanos (Fernández Suárez, 2003).

2.4.2.3. Límite Máximo de Residuos (LMR): Se define como la concentración máxima de residuo que puede ser aceptable en un alimento, resultado del uso de un medicamento veterinario en animales destinados al consumo humano y expresado en ug/Kg de peso fresco (Reglamento CE. 2377/90).

Para calcular este límite se parta de la IDA y de los alimentos que una persona puede consumir diariamente, con el objetivo de estimar la cantidad de sustancias/residuo marcador que puede estar presente en cada tejido objeto de consumo por una persona.

$\text{Concentración Segura} = \text{IDA (x 60 Kg)} / \text{Factor Consumo Alimento}$

El factor consumo está basado en la media de la ingesta que realiza un individuo de los diferentes tipos de alimentos. Este valor se ha fijado de acuerdo a los hábitos alimenticios de los diferentes países. Para poder establecer la distribución del consumo de alimentos, es necesario conocer el perfil cinético, en particular, el patrón de distribución del fármaco y/o metabolitos en el organismo de la especie destino. Para ello es necesario realizar estudios en los que se evalué la presencia del fármaco en los tejidos que se destinan al consumo.

Para conocer cual o cuales son los tejidos diana o sea los tejidos en los que la presencia del fármaco y/o metabolitos es susceptible de provocar reacciones adversas en el consumidor, se realizan generalmente estudios con el fármaco marcado radiactivamente (¹⁴C) de forma que su trazabilidad sea completa y permita identificar

la presencia de la totalidad de productos en cada uno de los tejidos procedentes de la especie destinados al consumo (El Korchi, 2006).

2.4.2.3.1. LMR de la Oxitetraciclina

El Comité Veterinario Europeo para productos medicinales (CVMP) ha evaluado el nivel máximo de residuos de OTC aceptable en un alimento de origen animal (EMEA, 1995). Para ello se ha partido de la IDA, estableciendo el valor de la ingesta diaria aceptable, con un factor de seguridad de 10, en 0.003 mg/Kg. Por lo tanto, para una persona de 60 Kg, esta IDA implicaría una dosis de 180 ug diarios. De acuerdo con esta IDA y con la distribución del fármaco en los tejidos, se han establecido para esta molécula los LMR en las distintas especies y tejidos destinados al consumo alimenticio.

Así, la OTC es uno de los fármacos que se encuentran en el Anexo I de la legislación de la Comisión Europea (CE) con un LMR fijado para todas las especies productoras de alimentos, en diferentes tejidos (hígado, riñón, músculo, leche y huevos) y está recogido en el reglamento (CE) n° 2377/90 de la comisión de 26 del junio de 1990, modificado por el reglamento (CE) n° 1570/98 de la comisión del 22 de julio de 1998. (Ver Cuadro 2) (El Korchi, 2006).

Cuadro 2. LMR de Oxitetraciclina fijado para todas las especies productoras de alimentos, en diferentes tejidos. Reglamento (CE) n° 1570/98

Sustancia Farmacológicamente Activa	Residuo Marcador	Especie Animal	LMR	Tejidos Diana
Oxitetraciclina	Suma de Medicamento Base y su 4 - epímero	Todas las especies productoras de Alimentos	100 ug/Kg	Músculo
			300 ug/Kg	Hígado
			600 ug/Kg	Riñón
			100 ug/Kg	Leche
			200 ug/Kg	Huevo
			25 ug/Kg	Miel

2.4.2.4. Periodo de Descanso: Para asegurar que los residuos de drogas hayan disminuido a una concentración adecuada luego de su uso en animales, un periodo específico de retiro de la droga debe ser observado previo a la comercialización de algún producto para consumo humano. Este tiempo de espera es el plazo de tiempo que debe transcurrir entre la última dosis suministrada al animal y el tiempo en que la concentración de residuos en los tejidos: músculo, hígado, riñón, piel, grasa, leche, huevos, miel es más bajo o igual al LMR. (Cholas, 1976; Nouws y Ziv, 1978; Jackson, 1980).

Estos tiempos se determinan en función del perfil cinético de la eliminación tisular de los fármacos (inalterado y/o metabolitos) en los animales. Cada antibiótico debe ir acompañado de un prospecto en donde conste el valor del tiempo de espera. No obedecer estas indicaciones supone un riesgo para la salud de los consumidores (Cancho Grande *et al.*, 2000).

2.5. METODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS ANTIBIÓTICOS

Los métodos de análisis de residuos antibióticos pueden describirse por sus características funcionales, en lugar de clasificarse por su finalidad o aplicación prevista. En este planteamiento alternativo los métodos se definen por la información y detalles analíticos facilitados con respecto a la cuantía y al carácter del analito o analitos de interés (Myllyniemi, 2004).

2.5.1. Clasificación de los Métodos

2.5.1.1. Tipo I

Cuantifican el volumen de un analito específico o una clase de analitos e identifican positivamente el analito, por lo que ofrece el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito en el tipo de interés. Por ejemplo HPLC.

2.5.1.2. Tipo II

Suelen determinar la concentración de un analito en el tipo de interés, pero no permiten una identificación inequívoca de la estructura.

2.5.1.3. Tipo III

Proporcionan una información menos definitiva pero útil. Estos procedimientos de ensayo determinan por lo general la presencia o ausencia de un compuesto o clase de compuestos en un tipo de interés especificado. Con frecuencia se basan en técnicas no instrumentales. En esta categoría se incluyen muchos de los procedimientos microbiológicos de ensayo con placas de agar (Codex Alimentarius, 1993).

2.5.2. Propiedades de los Métodos de Detección

2.5.2.1. Especificidad

Es la capacidad de un método para distinguir entre el analito de interés y otras sustancias que pueden estar presentes en la muestra objeto de ensayo.

2.5.2.2. Precisión

Es el grado de coincidencia entre los resultados obtenidos en ensayos independientes, a partir de un material de ensayo homogéneo, en las condiciones de empleo estipuladas.

2.5.2.3. Exactitud

Se refiere al grado de coincidencia entre el valor verdadero de la concentración del analito y el resultado medio que se obtiene aplicando un gran número de veces el procedimiento experimental a un conjunto de muestras homogéneas.

2.5.2.4. Sensibilidad

Es la medida de su capacidad para detectar la presencia de un analito y discernir pequeñas diferencias en la concentración de éste. La sensibilidad exige además la capacidad de distinguir entre el analito, los compuestos afines y las interferencias del medio (San Martín y Cañón, 2000).

Además de estas características básicas de los métodos, existen varias características accesorias convenientes para los métodos de análisis destinados a los programas reguladores de control. Los métodos deberán ser resistentes, eficaces en función de los costos, relativamente sencillos, transportables y capaces de manejar simultáneamente un conjunto de muestras de modo eficaz en función del tiempo, etc. (Myllyniemi, 2004).

2.5.3. Métodos Screening o de Cribado

Un método screening es el análisis de primera mano para el procesamiento de muestras con el fin de establecer la presencia o ausencia de residuos (Aerts *et al.*, 1995). Este debe ser un método capaz de rendir a bajo costo, además de procesar gran cantidad de muestras, debe ser óptimo en prevenir resultados falsos negativos y presentar un número aceptable de falsos positivos (Myllyniemi, 2004).

2.5.3.1. Métodos Microbiológicos

Los métodos microbiológicos son apropiados a gran escala debido a su comodidad y características de amplio espectro (Aerts *et al.*, 1995). Hoy en día la mayoría de métodos microbiológicos usados en el análisis de residuos antimicrobianos están basados en difusión agar (Myllyniemi, 2004).

Los métodos microbiológicos son inespecíficos, indican únicamente la presencia de un agente inhibidor. Los métodos fisicoquímicos son específicos y cuantitativos sin embargo estos conllevan a un mayor consumo de tiempo si la identidad de los antimicrobianos existentes buscados no son conocidos antes de comenzar el trabajo (Ferrini *et al.*, 1997).

2.5.3.1.1. Bacterias Utilizadas en las Pruebas Microbiológicas

El límite de detección de un método microbiológico para un antimicrobiano determinado, depende ante todo de la sensibilidad innata de la bacteria utilizada en tal método. El uso de esporas suspendidas en lugar de organismos vegetativos brinda buenos resultados (Cooper, 1972).

El *Bacillus subtilis* ha sido ampliamente utilizado (Bogaerts y Wolf, 1980; Johnston *et al.*, 1981; USDA, 1983; Nouws *et al.*, 1988; Koenen-Dierick *et al.*, 1995) debido a su sensibilidad frente a un amplio rango de antimicrobianos y debido a su disponibilidad comercial en esporas suspendidas. Entre los métodos de mayor difusión que hacen uso de esta bacteria tenemos: El método de las cuatro placas (FPT) (Bogaerts y Wolf, 1980), Prueba in situ con torundas (STOP) (USDA, 1979), método de las dos placas (MAF, 2001), entre otros.

El *Bacillus megaterium* es la bacteria de la prueba para antibióticos y sulfamidas en terneros (CAST) (USDA, 1984). Cepas de *Bacillus cereus* han sido usadas para el screening de residuos de tetraciclinas (Bugyei *et al.*, 1994; Okerman *et al.*, 2001).

El *Bacillus stearothermophilus* ha sido usado también ampliamente (Bielecka *et al.*, 1981; Braham *et al.*, 2001). Es la bacteria utilizada en los métodos Premir test, en el Charm Farm Test (CFT), y en el test de reducción negro brillante (BR Test) (Lloyd y Van der Merwe, 1987). El problema con *B. stearothermophilus* es su sensibilidad frente a la actividad inhibitoria de la lisozima (Van Schothorst y Peelen-Knol, 1970), haciendo a la bacteria menos conveniente para la detección de residuos en tejido renal.

Las bacterias no esporuladoras son usados también como microorganismos de diferentes métodos. Dentro de estas el *Micrococcus luteus luteus* (Nouws, 1979; Bogaerts y Wolf, 1980; Okerman *et al.*, 2001) es especialmente sensible a b-lactámicos y macrólidos (Okerman *et al.*, 1998) y es utilizada junto con el *Bacillus subtilis* en el método de las cuatro placas (Bogaerts y Wolf, 1980).

2.5.3.1.2. Método de Difusión Agar

2.5.3.1.2.1. Formación de una Zona de Inhibición

En métodos de difusión agar, el agar es inoculado de forma estandarizada, y las muestras son aplicadas en su superficie. Durante las primeras horas de difusión, la concentración de antimicrobianos en el borde de la muestra es relativamente alta y disminuye bruscamente conforme se aleja de la muestra (Barry, 1976).

Al inicio la difusión procede radialmente desde la muestra. Cuando la parte inferior de la capa de agar es alcanzada, la dirección gira a lateral. El grosor del agar es inversamente proporcional al tamaño de la zona de inhibición (Currie *et al.*, 1998; Koenen-Dierick y De Beer, 1998). En alguna distancia en particular de la muestra, el antimicrobiano es diluido a un punto que ya no inhibe el crecimiento microbiano, y una zona de inhibición es formada. Bajo condiciones estandarizadas, el tamaño de la zona de inhibición muestra una relación lineal con la concentración logarítmica de la droga (Schoevers *et al.*, 1994).

La velocidad de difusión a través de un gel agar depende de la concentración de la droga en la muestra, el tamaño y configuración de la molécula antimicrobiana, la viscosidad del gel agar y la temperatura (Barry, 1976).

El tiempo de preincubación, permite al antimicrobiano difundirse en el agar antes que la bacteria probada comience a crecer, incrementando la sensibilidad del método de difusión, sin embargo el efecto no es igualmente importante para todas las sustancias (Koenen-Dierick y De Beer, 1998).

El ancho de la zona de inhibición puede ser cuantificada con regla o sistema de análisis por imagen computarizada (Figura 6) (Schoevers *et al.*, 1994). Desde el borde exterior de la droga difundida, podría existir una zona de inhibición completa de crecimiento rodeado por una zona de crecimiento microbiano parcialmente inhibido, cerca de una zona de crecimiento microbiano estimulado (Barry, 1976).

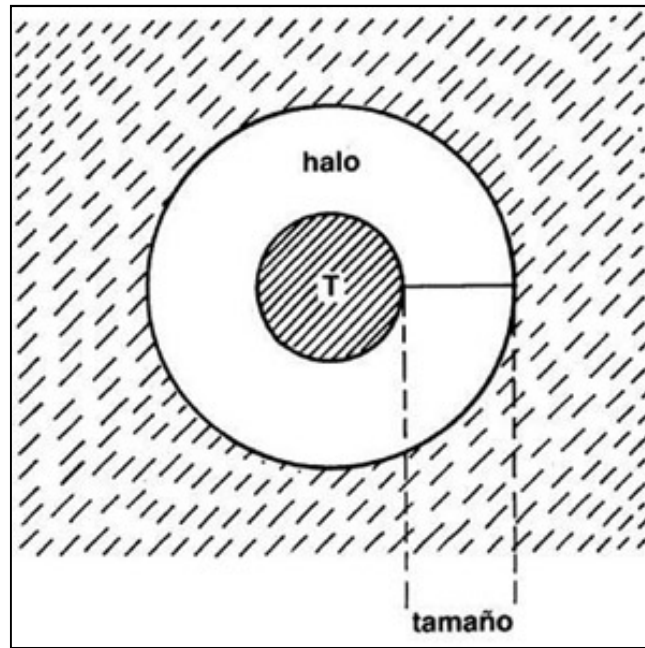


Figura 6. Determinación del tamaño del halo de inhibición formado alrededor de una muestra.

2.5.3.1.2.2. Composición del Medio de Crecimiento

La capacidad general de los nutrientes del medio ejercen influencia sobre las bacterias del método (Barry y Effinger, 1974); así medios nutricionalmente deficientes producen zonas de inhibición mayores.

El pH del medio afecta la actividad de ciertos antimicrobianos. La actividad de las aminopenicilinas y tetraciclinas están incrementadas en pH ácidos, y la actividad de macrólidos, quinolonas, y aminoglucósidos están incrementadas en pH alcalino (De Zutter *et al.*, 1985). El mecanismo de efecto del pH en la actividad antimicrobiana no está completamente dilucidada y se presenta inconsistentemente entre droga y droga (Amsterdam, 1996).

2.5.3.1.2.3. Métodos de difusión agar usados comúnmente y su límites de detección (LOD)

No existe un procedimiento estandarizado para la determinación de los límites de detección (LOD) en un método de difusión agar. Por tanto, varios procedimientos han sido aplicados en su determinación (Nouws *et al.*, 1988; Kondo *et al.*, 1993; Koenen-Dierick *et al.*, 1995; Currie *et al.*, 1998; Okerman *et al.*, 2001), complicando la comparación de resultados. La naturaleza del diluyente también afecta los límites de detección (Bielecka *et al.*, 1981; Korsrud y Mac Neil, 1988; Braham *et al.*, 2001).

Cada uno de los actuales y potenciales métodos de screening presenta limitaciones en sensibilidad, especificidad, u otros atributos de desempeño (Korsrud *et al.*, 1998), haciendo necesaria la creación de métodos más avanzados. Aunque los métodos de inhibición microbiológicos son convenientes para el screening a gran escala, es obvio que no hay ningún método el cual detecte muestras con concentraciones de residuos de todos los antimicrobianos por encima de los LMR y no falle en alguno de ellos, y presente además un número de resultados positivos para muestras con concentraciones por debajo LMR (Croubles *et al.*, 1999).

2.5.3.1.2.4. Zonas de Inhibición Inespecíficas

Los test microbiológicos de inhibición son inespecíficos por naturaleza, es decir cualquier sustancia con actividad antimicrobiana podrían inhibir el crecimiento bacteriano. La inhibición no causada por drogas antimicrobianas es llamada inespecífica, y el resultado de esta inhibición es llamado una reacción falsa positiva (Myllyniemi, 2004).

Muchos antimicrobianos fueron desarrollados por ocurrencia natural, de metabolitos fúngicos con grandes propiedades de inhibición antibacterianas, pero baja toxicidad animal. Productos naturales de metabolitos fúngicos como las micotoxinas poseen características antibacterianas entre las cuales tenemos: la aflatoxina, ocratoxina A, patulina, citrinina, ácido tenuazonico, alternariol, y varios tricotenos (Berdy, 1974), y

sustancias antibacterianas no identificadas de granos con mohos (Williams *et al.*, 1992), podrían causar inhibición en las muestras.

El tejido renal de cerdo expuesto a daño mecánico por congelamiento ha sido suspendido por ser causante de zonas de inhibición inespecífica. Casi todos los riñones de animales sacrificados contienen una enzima bacteriolítica llamada lisozima (Heinert *et al.*, 1976). La lisozima es activo contra la mayoría de bacterias gram positivas, particularmente formadores de esporas termofílicas (Beuchat y Golden, 1989).

Cambios en el pH podrían causar reacciones falso positivas (Tritschler *et al.*, 1987). La orina del bovino a pH 7,5 inhibe el crecimiento de *B. stearothermophilus* (Bielecka *et al.*, 1981). El alto promedio de osmolaridad y pH de las muestras de orina son relacionadas con inhibición del crecimiento de *B. subtilis* (Terhune y Upson, 1989), pero (Erasmuson *et al.*, 1998) encontró que aunque la alcalinidad de las muestras de orina estuvo asociado con reacciones falsos positivas, la inhibición actual fue causada por el bicarbonato.

La contaminación bacteriana podría también ser una causa importante de resultados falsos positivos (Okerman *et al.*, 1998).

2.5.3.2. Métodos Inmunoquímicos

Las principales características de estos métodos son su sensibilidad, selectividad, sencillez y rapidez. Es precisamente la alta sensibilidad de muchos de los inmunoensayos desarrollados hasta la fecha lo que constituye uno de los mayores puntos de apoyo de esta metodología, habiéndose alcanzado límites de detección por debajo de 0,1 µg kg⁻¹ (Pastor-Navarro *et al.*, 2006), con gran selectividad y tratamiento de muestra mínimo.

Sin embargo el desarrollo de nuevos ensayos inmunoquímicos requiere resolver satisfactoriamente distintos aspectos como su elevado precio y en ocasiones, poca versatilidad, la caducidad de los reactivos y su falta de reproducibilidad, especialmente

cuando se usan por personal no entrenado. A pesar de ello, ha de reconocerse su gran potencial (Pastor-Navarro *et al.*, 2007).

Respecto a los ensayos inmunoquímicos, el formato más usado para la determinación de residuos es el ELISA (Ensayo Inmuno absorbente ligado a enzimas). El principio básico del ELISA radica en la competición que se establece entre el analito sin marcar y el analito marcado por los sitios específicos de unión de un anticuerpo específico. La medida de la señal proporcionada por el marcador está relacionada inversamente con la cantidad de analito presente en la muestra (Dixon-Holland, 1992).

En este sentido, la empresa r-Biopharm, dispone de kits comerciales Ridascreen basados en formato ELISA y detección colorimétrica para la determinación de tetraciclinas (TCs) en leche, carne y miel. Este ensayo presenta valores de reactividad cruzada superiores al 100% para otras TCs como minociclina (MNC), rolitetraciclina (RTC) y CTC. Aplicando este kit, (Aga *et al.*, 2005) determinan la persistencia de las TCs y sus productos de degradación en enmiendas orgánicas, expresando los resultados como “TCs totales”.

Otro ensayo disponible hoy en día es el Charm II Tetracycline Test. Este radioinmunoensayo (RIA) utiliza un contador de centelleo líquido como detector y permite la detección de TC, OTC, CTC, DXC y MNC en leche, miel, huevos, pescado, etc., con buena sensibilidad ($LOD < LMR$) (Münstedt *et al.*, 2005).

Recientemente se ha incorporado un nuevo dispositivo comercial basado en un inmunoensayo fluorescente en fase sólida con formato competitivo (SPFIA) denominado Parallax. El sistema ha sido aplicado satisfactoriamente para la determinación de residuos de antibióticos del grupo betalactámicos, TCs y sulfonamidas en leche. Okerman *et al.* (2003) han aplicado el test para la determinación de residuos de antibióticos en riñones.

Finalmente, el Tetrasensor es un test receptor en formato de tira (*dipstick*) para el cribado de TCs (CTC, DXC, Metaciclina, MN, OTC y TC) en tejidos de animales,

huevos, leche y miel. Alfredsson *et al.* (2005) han aplicado el test para la determinación de residuos de TCs (TC, OTC, CTC y DXC) en miel y huevos.

2.5.3.3. Otras Técnicas Usadas en el Screening e Identificación de Residuos

Bajas concentraciones de tetraciclinas pueden inducir la síntesis de b-galactosidasa en cepas de *E.coli* que contienen genes de fusión tetA – lacZ (Bertrand *et al.*, 1984). Chopra *et al.* (1990) desarrollaron un método para la detección de tetraciclinas, en el cual cepas de *E.coli* contienen un clonado *tetA-lacZ* gen de fusión donde fue usada la b-galactosidasa y fue fácilmente detectada con sustrato cromogénico.

Korpela *et al.* (1998) desarrollo un método microbiológico basado en luminescencia para la detección de tetraciclinas. Este utiliza *E.coli* que contiene un sensor plásmido en el cual una tetraciclina específica única de control regula la expresión de genes bacterianos. La bacteria emite luz azul visible en presencia de las tetraciclinas. El sensor es propiamente luminiscente (Chopra *et al.*, 1990), es decir la luz es emitida sin adición de sustratos o cofactores.

Residuos de tetraciclinas en huesos pueden ser detectados por un fluorescente específico (Buyeske *et al.*, 1960). Haagsma y Mengelers (1989) describe un método de screening fluorimétrico para la detección de residuos de tetraciclinas en carne de cerdo y tejido renal, y (Kühne *et al.*, 2000) para la detección de tetraciclinas en huesos.

El Premi®Test integra la estrategia de detección de sustancias antibacterianas en el nivel o por debajo del LMR en un amplio espectro de muestras biológicas incluyendo huevos. Los métodos convencionales requieren una incubación de una noche. Por otra parte el Premi®Test provee resultados fiables dentro de 3 horas de incubación (Lohajová *et al.*, 2004). El principio del test está basado en la inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus* y el cambio de color del medio de cultivo cuando la muestra es negativa (El color del medio no cambia en presencia de residuos).

2.5.4. Métodos Cuantitativos Confirmatorios

Entre los métodos cuantitativos comúnmente usados para la detección de residuos de drogas veterinarias se incluyen: la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía a Gas (GC), cromatografía de capa fina (TLC), espectrometría de Masa (MS) (Aerts *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 2000).

A pesar de ser considerados los métodos de confirmación por excelencia, los métodos cromatográficos no están exentos de inconvenientes, destacando la dificultad de analizar grandes volúmenes de muestras en tiempo reducido indispensable para llevar a cabo programas de vigilancia y control efectivos, por lo que es necesario desarrollar nuevos métodos más simples y rápidos (Pastor-Navarro *et al.*, 2007).

Los métodos químicos usualmente proceden con una extracción preliminar con el fin de aislar la droga de interés de la muestra biológica. El principal objetivo del tratamiento de la muestra son la remoción de macromoléculas y otros constituyentes de la muestra que podrían afectar adversamente el sistema cromatográfico o interferir con la detección, y enriquecimiento del analito con el fin de lograr límites bajos de detección requerido (Aerts *et al.*, 1995).

La baja solubilidad de algunos antimicrobianos en solventes orgánicos ha hecho difícil desarrollar procedimientos para extraer y concentrar los residuos de las muestras biológicas. Otros antimicrobianos son incluso insuficientemente volátiles o demasiado inestables térmicamente (o ambos) para permitir sus análisis usando GC o GC-MS. La cromatografía líquida (LC) ha emergido como el método de elección para la determinación de antimicrobianos bastante polares, no volátiles, y algunas veces sensibles al calor (Kennedy *et al.*, 1998).

El desarrollo de métodos de Cromatografía Líquida–Espectrometría de Masa ha incrementado el rango de antimicrobianos, para que ensayos, basados en espectrometría molecular, puedan ser desarrollados (Niessen y Tinke, 1995).

La TLC es una técnica muy empleada para el análisis de residuos de TCs en alimentos (Oka *et al.*, 2000). En general, permite analizar simultáneamente varias muestras sobre la misma placa, con un costo relativamente bajo, y una selectividad y sensibilidad aceptables. Petkovska *et al.* (2006) han desarrollado un método de TLC para la determinación de TC, OTC, CTC en muestras de leche por debajo del LMR permitido. A pesar de ello, esta metodología requiere laboriosas etapas de tratamiento de muestra y purificación con el fin de evitar interferencias, lo que incrementa el tiempo de análisis y su coste.

2.6. RESIDUOS ANTIBIÓTICOS EN HUEVOS

Las propiedades fisicoquímicas de las drogas así como la fisiología del ave y la formación del huevo determinaran que tanta droga podrá ser depositada en el huevo (Kan y Petz, 2000).

Martínez (1998) en una reciente revisión presta atención a las siguientes propiedades fisicoquímicas: a) La unión a las proteínas plasmáticas, el cual determina su disponibilidad a otros compartimentos. b) El peso molecular, es decir moléculas que son demasiados voluminosas no están dispuestos a atravesar la membrana. c) La solubilidad lipídica, determinado por el coeficiente de partición octanol/agua. d) El valor de pKa, el cual determina si una molécula es ionizada a un cierto pH. De acuerdo a algunas teorías solo un componente ionizado podría penetrar a las membranas biológicas.

Recientemente, se identificó también el rol importante que cumple el ovario como regulador en la transferencia de drogas dentro de la yema del huevo (Donoghue *et al.*, 1996).

Donoghue *et al.* (1997) concluyó que: a) La incorporación de drogas en los folículos preovulatorios durante su dosificación podría ser un importante depósito de residuos en huevos, incluso días a semanas después de retirada la droga y que además b) El patrón de incorporación de drogas en folículos en desarrollo podría ser predictivo del patrón de

residuos contenidos en la secuencia de huevos puestos durante y después del retiro de la droga.

Desafortunadamente, en la evaluación del huevo entero se podrían enmascarar potencialmente, niveles residuales elevados de drogas u otros contaminantes en la yema y la clara. Numerosos estudios han demostrado que algunas drogas son depositadas preferentemente en la yema y otros en la clara (Yoshimura *et al.*, 1991; Donoghue *et al.*, 1994; Kan *et al.*, 1996; Keukens *et al.*, 1996).

Ambos Anhalt (1977) y Hafez (1991) consideran a la yema como el principal compartimiento del huevo a ser tomado en cuenta a la hora de evaluar residuos de drogas. Esto en contraste a la observación de (Blom, 1975) citado por ambos autores quienes reportan residuos mucho más altos de algunas sulfonamidas en clara que en yema.

Provocado por la observación que residuos de parte lipofílica, como la doxiciclina muestran residuos más altos en clara que en yema (Kan y Petz, 2000), un estudio sistemático con 11 diferentes sulfonamidas fue llevado a cabo. Aves de postura estuvieron expuestas a sulfonamidas con un rango de valores de pKa y lipofilicidad. En este estudio ninguna relación obvia pudo ser encontrada. Las sulfonamidas mostraron niveles apreciables tanto en la clara y yema y con la posible excepción de niveles de sulfaguanidina, que en algunos casos se observaron mayormente en la clara (Kan y Jacobs, 1998).

Muchas otras sustancias como los macrólidos y nitrofuranos muestran patrones divergentes de distribución. Algunos componentes como la trimetoprina, pyrimetamina, amprolio, decoquinato, diniltomida, e ivermectina muestran niveles mucho más bajos en clara, mientras que las quinolonas, la flumequina y el ácido oxolínico muestran niveles mayores en la clara que en la yema (Kan y Petz, 2000).

2.6.1. Residuos de Tetraciclinas en Huevos

La unión europea (EU) (Commission Regulation 281/96) acordó niveles máximos residuales (LMR) de 200 ug/kg para cada tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina o clortetraciclina) en huevos.

Dipeolu *et al.* (2005) demostraron que la tetraciclinas administrada a las aves, es transferida continuamente al huevo, mientras el metabolismo de la droga continué en el cuerpo de la aves ponedoras.

Roudaut *et al.* (1987, 1989) reportaron que los niveles residuales de las tetraciclinas son mayores en la yema en comparación a la clara. Ellos utilizaron un ensayo microbiológico inespecífico para el análisis.

Zurgelle *et al.* (2000) demostraron la presencia de metabolitos de la oxitetraciclina, tetraciclina, isoclortetraciclina, clortetraciclina en la yema del huevo y plasma sanguíneo mediante el análisis por HPLC. En la clara sólo se observaron metabolitos para la oxitetraciclina y tetraciclina.

(Kan y Rump, observación no publicada) evaluaron la distribución de la doxiciclina en huevos que presentaron almacenamiento prolongado, con separación directa de la clara y yema y ninguna diferencia en el patrón de distribución fueron encontrados. El intercambio de las drogas entre la yema y la clara durante la formación del huevo especialmente durante las 18 h de la deposición de la cáscara a una temperatura corporal de 41°C puede sin embargo , no ser desestimada.

2.7. RESIDUOS DE TETRACICLINAS EN OTROS TEJIDOS

En Tehran, provincia de Irán, se recolectaron 270 muestras de pollos de los siguientes órganos: músculo, hígado, riñón, de 90 establos por un periodo de 1 año comenzado en agosto 2001. El HPLC fue utilizado para separar detectar y analizar residuos de oxitetraciclina en las muestras. Todas las muestras mostraron residuos de

oxitetraciclina y muestras de 86 (95.55%) de granjas mostraron residuos de oxitetraciclina por debajo de los LMR 25 (27.77%), 86 (95.55%) y 17 (18.88%) de músculo, hígado y riñón mostraron residuos de oxitetraciclina por debajo LMR respectivamente. La principal concentración de oxitetraciclina en músculo, hígado, riñón fueron 88.217 ± 44.503 SD, 576.657 ± 201.908 SD y 517.56 ± 186.64 SD ng/g respectivamente (Salehzadeh *et al.*, 2006).

Este estudio confirma el uso incorrecto de la oxitetraciclina en granjas y la carencia de implementación de periodo de retiros recomendados. También los resultados de este estudio enfatizan la cada vez más difícil regulación para el uso de antimicrobianos en la industria avícola así como también la inspección de pollos antes de su venta.

Fortt *et al.* (2006) en un estudio en peces silvestres detectaron niveles de tetraciclinas y quinolonas en niveles menores a lo LMR, sin embargo ellos indican claramente que la fauna silvestre alrededor de los recintos de agricultura está siendo contaminadas por antimicrobianos. Para su evaluación se utilizaron muestras de músculo y su posterior detección se realizó por HPLC.

Ruz *et al.* (2004) determinaron doxiciclina en suero mediante UV-HPLC, alcanzando un límite de detección de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, y recuperaciones que oscilan entre el 97% y 107%. Utilizando la misma técnica, (Münstedt *et al.*, 2005) determinaron OTC y CTC en miel, previa dilución de las muestras y extracción en fase sólida (LOD $25 \mu\text{g kg}^{-1}$).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología y Unidades de Aislamiento Experimental de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

3.2. ANIMALES EXPERIMENTALES

Un lote de 20 gallinas de postura comercial (Isa Brown) de 50 semanas de edad fueron distribuidas completamente al azar en cinco tratamientos (Figura 7) a los cuales se le suministro oxitetraciclina en forma profiláctica y terapéutica, así como vía agua de bebida y alimento por 7 días. El grupo control recibió alimento y agua libre de antibiótico. Los residuos del antibiótico en los huevos se evaluaron por puesta diaria durante el periodo de administración y por los próximos 14 días luego de finalizado éste. Con el fin de evitar la presencia residual de antibióticos por dosificación previa en granja antes de la adquisición de las gallinas, una vez obtenidas éstas se las sometió a 2 semanas de periodo pre-experimental donde sólo se le brindo alimento y agua, luego del cual se confirmó la ausencia de residuos antibióticos antes de iniciar el experimento. Las aves contaron con 14 h de luz diaria.



Figura 7. Distribución de las gallinas en tratamientos

3.3. TRATAMIENTOS

Los tratamientos se dispusieron de la siguiente forma:

- **Tratamiento A:** Oxitetraciclina en dosis profiláctica (118 g/1000 L) vía agua de bebida
- **Tratamiento B:** Oxitetraciclina en dosis terapéutica (156 g/1000 L) vía agua de bebida
- **Tratamiento C:** Oxitetraciclina en dosis profiláctica (200 g/t) vía alimento
- **Tratamiento D:** Oxitetraciclina en dosis terapéutica (156 g/1000 L y 300 g/t) vía agua de bebida y alimento, respectivamente.,
- **Tratamiento E:** Control, agua y alimento libres de oxitetraciclina

3.4. INSTALACIONES Y EQUIPOS DE CRIANZA

Se hizo uso de las Unidades de Aislamiento Experimental de Aves de la FMV – UNMSM, en donde se implementó jaulas, tolvas para alimento y agua, además de focos de iluminación de 100 watts cada uno.

3.5. ALIMENTACIÓN

Tanto el agua como el alimento de postura (TAKAGAKI Bolsas de 40 Kg) fueron suministrado *ad libitum*.

3.6. EQUIPAMIENTO Y MATERIAL DE LABORATORIO

3.6.1. Equipos

- a) Estufas de incubación $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- b) Autoclave
- c) Baño María
- d) Refrigeradora
- e) Congelador con temperatura igual o menor a $-20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- f) Agitador tipo vortex
- g) Balanza analítica
- h) Fotocolorímetro
- i) Potenciómetro

3.6.2. Materiales

- a) Sacabocados de 8 mm de diámetro
- b) Pinzas
- c) Placas de Petri de 100 mm de diámetro
- d) Erlenmeyers de 125, 250 y 500 mL de capacidad
- e) Matrices de 20, 25, 50, 100 y 500 mL de capacidad
- f) Tubos de ensayo de 16 x 160 mm
- g) Pipetas de 10 μL y 1, 2 y 10 mL
- h) Pipeta automática regulable de 10 a 100 μL y tips
- i) Bolsas Ziploc
- j) Tubos vacutainers
- k) Tubos Tapa Rosca
- l) Hisopos estériles

- m) Mechero
- n) Frascos de Medios
- ñ) Regla medidora de halo de inhibición

3.7. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- a) Agar Muller Hinton
- b) Discos control de sensibilidad a la Oxitetraciclina
- c) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Figura 8)
- d) Estándar Mc Farland 0.5
- e) Tween 20
- f) Fosfato Buffer pH 4.5



Figura 8. Cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

3.8. MÉTODO

Los residuos de oxitetraciclina fueron evaluados semi-cuantitativamente e individualmente para cada huevo mediante la técnica de difusión en agar modificada por Katz y Fassbender (1972).

3.8.1. Preparación del Agar Mueller Hinton

- Se preparó el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Se autoclavó y dejó enfriar en baño de agua hasta que alcanzó los 45°C – 50°C.
- Una vez esterilizado y solidificado, se midió el pH del agar. El valor del mismo, se encontró entre 7.2 y 7.4 a temperatura ambiente. Esta medición se realizó con la ayuda de un potenciómetro.
- Se repartió el medio en placas petri (25 ml, para placas de 90 mm de diámetro interno respectivamente), de manera que el grosor del agar en la placa fue de 4 mm. (Figura 9).
- Se realizó las pruebas de esterilidad para cada lote de Mueller Hinton, incubando una o dos placas de cada lote a 30 °C – 35 °C durante 24 horas. Estas placas utilizadas fueron luego descartadas.

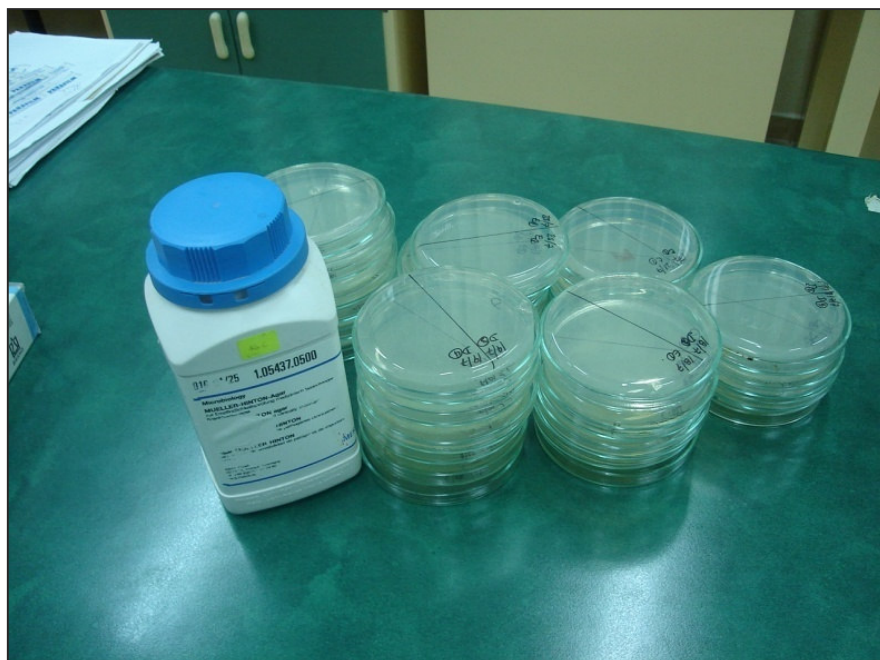


Figura 9. Placas de agar Mueller Hinton.

3.8.2. Preparación del Estándar (Mc Farland) para el inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se uso una suspensión de sulfato de bario (0.5 de la escala de Mac Farland) como estándar.

3.8.2.1. Preparación del Estándar de Turbidez

- Se agregó 0.5 ml de una solución de BaCl_2 0,048 M ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1.175% P/V) a 99.5 ml de una solución de H_2SO_4 0,18 M (0.36 N) (1% V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.

- Se verificó la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro, cuya absorbancia a 625 nm fue 0.08 a 0.10 para el estándar 0.5 Mc. Farland.

- Se distribuyó de 4 ml a 6 ml en tubos con tapa rosca o tapón de jebe, similares a los que se usaron para preparar el inóculo.

- Antes de ser usado se agitó vigorosamente dicho estándar, en un agitador mecánico.

3.8.3. Preparación del Inóculo (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)

3.8.3.1. Método de Desarrollo Previo

- Se seleccionó cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en placa con *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

- Se tocó la superficie de cada colonia con un ansa de siembra y se transfirió a un tubo que contenía de 4 a 5 ml de caldo apropiado (Caldo Tripticasa de Soya).

- Se incubó el caldo a una temperatura entre 35°C – 37°C, hasta que alcanzó o excedió la turbidez del estándar 0.5 de la escala Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas).

- Se ajustó la turbidez del inóculo con solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente se uso una luz apropiada y se visualizo los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

3.8.4. Preparación de la Muestra

- Los huevos fueron pesados y homogenizados en una solución al 0.75% de Tween 20 en Buffer fosfato (pH 4.5)

- La solución utilizada fue el doble del peso de los huevos.

- Posteriormente el homogenizado fue calentado a 85 °C por 5 minutos y centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, obteniéndose el sobrenadante (Figura 10), el cual fue inoculado en las placas. El sobrenadante que no fue utilizado inmediatamente se almacenó a – 20 °C hasta el análisis.

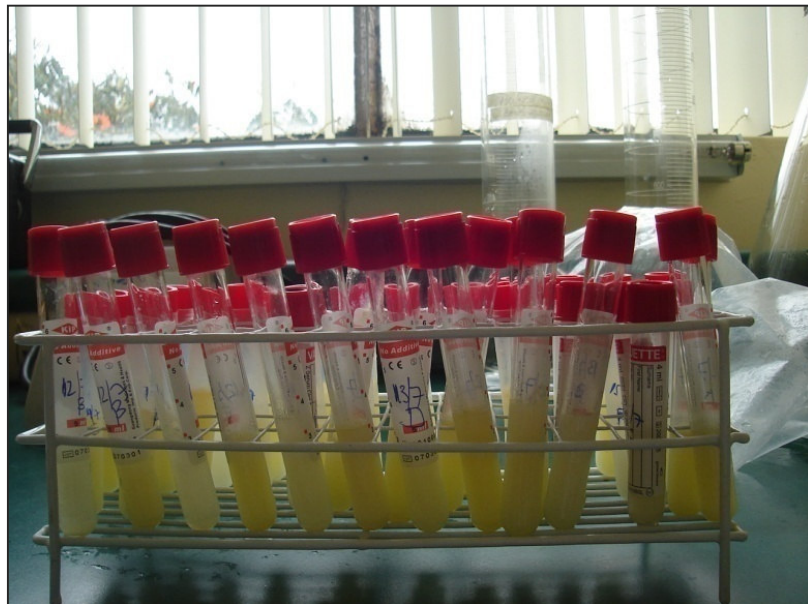


Figura 10. Obtención de la muestra lista para ser inoculada.

3.8.5. Inoculación de las Placas

- Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se giró el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

- Se inoculó en la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura 11). Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 – 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial fuera absorbido.



Figura 11. Sembrado del *Bacillus subtilis* sobre la superficie del agar

- Luego se inoculó 200 μ l de la muestra en hisopos dentro de los agujeros hechos en el agar previamente sembrado con *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (Figura 12).

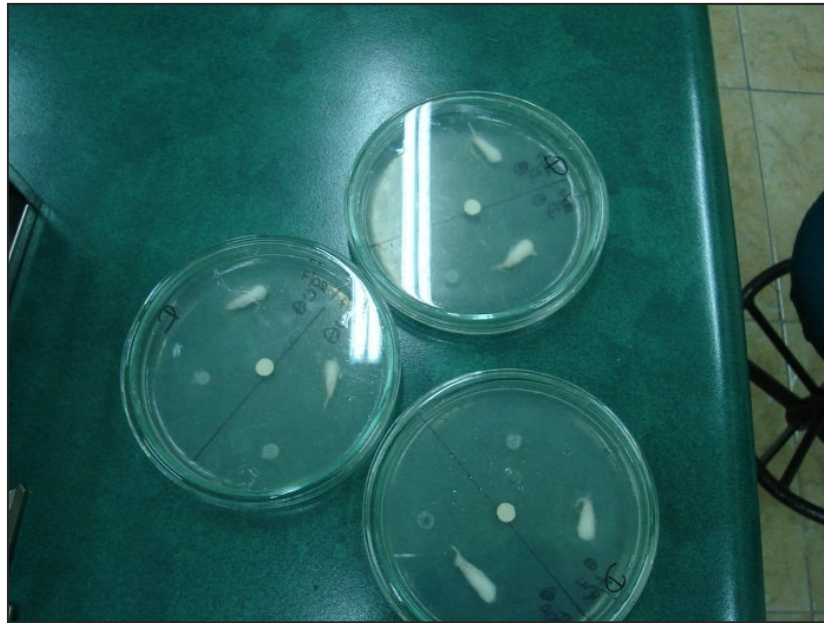


Figura 12. Muestra colocada en el agar sembrado previamente con el inóculo.

3.8.6. Aplicación de los Discos Control

Se colocó los discos control de oxitetraciclina sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

3.8.7. Incubación

Se incubó las placas a 37°C por 24 horas.

3.8.8. Lectura de las Placas e Interpretación de los Resultados

- Se midió los diámetro de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla especial. Se mantuvo iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro.

- El punto final se tomó como el área que no mostró un crecimiento obvio, visible, que pudo ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que pudieron solo ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto de las diferentes dosis y formas de dosificación sobre la presencia de residuos antibióticos en términos de halo de inhibición se evaluó usando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS.

VI. RESULTADOS

El presente estudio produjo los siguientes resultados:

No se observó evidencia de residuos de oxitetraciclina en huevos durante el periodo de Pre – dosificación en ningún tratamiento (Cuadro 3).

A partir del segundo día de dosificación, se empezó a detectar la presencia de residuos de oxitetraciclina reflejados en la presencia de halos de inhibición. Se identificaron 3 muestras positivas. Una muestra en el tratamiento terapéutico agua de bebida (2 mm de halo de inhibición), y dos muestras en el tratamiento terapéutico agua y alimento (4 mm de halo de inhibición c/u). El detalle se observa en el cuadro 4, no encontrándose diferencia en los halos de inhibición entre tratamientos.

Durante el 3er y 4to día de dosificación el efecto residual de la oxitetraciclina se presentó más marcado, observándose halos de inhibición de hasta 8 mm en el tratamiento terapéutico agua y alimento. Los grupos con dosis profilácticas no presentaron muestras positivas (Cuadro 5). Se encontró diferencia significativa en las medidas del halo de inhibición entre tratamientos ($p < 0.05$).

En el 5to, 6to y 7mo día se identificó el mayor tamaño de halo de inhibición el cual estuvo reflejado en el tratamiento terapéutico agua y alimento con dos muestras de 10 mm de halo (Figura 13). En este momento ambos tratamientos profilácticos empezaron a mostrar resultados positivos de hasta 2 mm y 4 mm para el tratamiento profiláctico en

alimento y profiláctico en agua respectivamente (Cuadro 6). La diferencia entre las medidas del halo de inhibición fue significativa ($p < 0.05$).

Durante el inicio del periodo de retiro de la droga (1er y 2do día), se puede notar claramente la disminución en el tamaño de halo de inhibición de los tratamientos terapéuticos. El tratamiento terapéutico en agua y alimento fue el único grupo en mostrar aún la totalidad de sus muestras positivas (Cuadro 7). La diferencia entre las medidas del halo de inhibición fue significativa ($p < 0.05$).

A partir del 3er y 4to día de retiro, se notó la ausencia de resultados positivos para ambos tratamientos profilácticos. Mientras tanto, el panorama en los tratamientos terapéuticos arrojaban resultados positivos pero con un tamaño de halo de inhibición disminuido. El tratamiento terapéutico agua mostró un halo de inhibición de 2 mm, mientras que el tratamiento terapéutico agua y alimento presento halos de 2 y 4 mm (Cuadro 8). La diferencia entre tratamientos aún estaba presente ($p < 0.05$).

A partir del 5to día de retiro, la totalidad de resultados fueron negativos (Cuadro 9), denotando homogeneidad entre los tratamientos.

El tratamiento Control no presentó niveles residuales de oxitetraciclina durante el transcurso del experimento (Figura 14).

El disco control de oxitetraciclina presentó un valor medio de 26 mm en todas las placas evaluadas.

En cuanto al porcentaje de positividad, el tratamiento D fue el grupo que presentó mayores muestras positivas con un 45.61%, mientras que el mayor número de muestras negativas estuvo en el tratamiento C con 93.18%. En total se analizaron 249 muestras (Cuadro 10).

En la figura 15 se muestra el patrón de distribución residuos de oxitetraciclina medidas en términos de halo de inhibición y tiempo. Para realizar la figura se tomo el mayor de halo de inhibición por tratamiento por grupo de días.

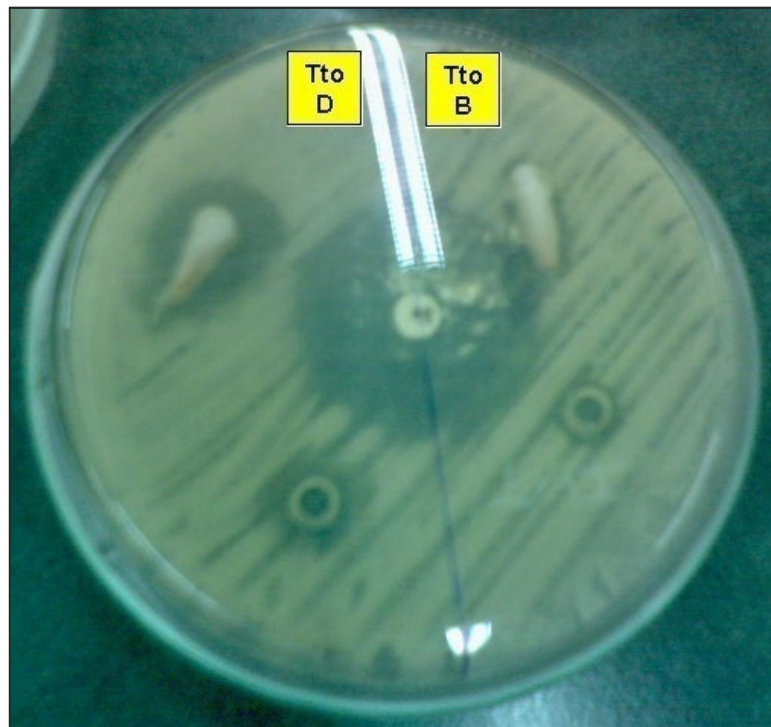


Figura 13. Halo de inhibición de 10 mm observada en el tratamiento D (Terapéutico alimento y agua)

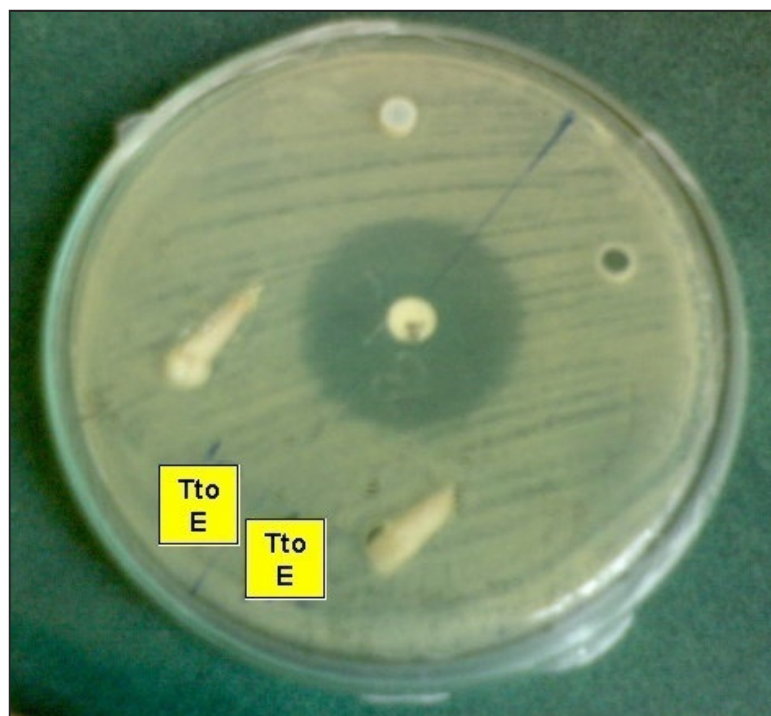


Figura 14. Ausencia de halo de inhibición en el tratamiento control

Cuadro 3. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el periodo de Pre – dosificación.

Tratamientos	Tamaño de halo de inhibición (mm)						Total
	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	
A. Profiláctico, agua	4	-	-	-	-	-	4
B. Terapéutico, agua	4	-	-	-	-	-	4
C. Profiláctico, alimento	4	-	-	-	-	-	4
D. Terapéutico, alimento y agua	4	-	-	-	-	-	4
E. Control	4	-	-	-	-	-	4
Total	20	-	-	-	-	-	20

Cuadro 4. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 1er y 2do día de dosificación.

Tratamientos	Tamaño de halo de inhibición (mm)						Total
	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	
A. Profiláctico, agua	4	-	-	-	-	-	4
B. Terapéutico, agua	6	1	-	-	-	-	7
C. Profiláctico, alimento	4	-	-	-	-	-	4
D. Terapéutico, alimento y agua	4	-	2	-	-	-	6
E. Control	4	-	-	-	-	-	4
Total	22	1	2	-	-	-	25

Cuadro 5. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 3er y 4to día de dosificación.

Tratamientos	Tamaño de halo de inhibición (mm)						Total
	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	
A. Profiláctico, agua	5	-	-	-	-	-	5
B. Terapéutico, agua	3	-	2	-	-	-	5
C. Profiláctico, alimento	5	-	-	-	-	-	5
D. Terapéutico, alimento y agua	-	1	3	1	1	-	6
E. Control	5	-	-	-	-	-	5
Total	18	1	5	1	1	-	26

Cuadro 6. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 5to, 6to y 7mo día de dosificación.

Tratamientos	Tamaño de halo de inhibición (mm)						Total
	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	
A. Profiláctico, agua	2	4	1	-	-	-	7
B. Terapéutico, agua	-	3	4	2	-	-	9
C. Profiláctico, alimento	4	2	-	-	-	-	6
D. Terapéutico, alimento y agua	-	-	-	3	5	2	10
E. Control	7	-	-	-	-	-	7
Total	13	9	5	5	5	2	39

Cuadro 7. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 1er y 2do día de retiro.

Tratamientos	Tamaño de halo de inhibición (mm)						Total
	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	
A. Profiláctico, agua	2	2	-	-	-	-	4
B. Terapéutico, agua	1	-	3	-	-	-	4
C. Profiláctico, alimento	3	1	-	-	-	-	4
D. Terapéutico, alimento y agua	-	-	1	1	2	-	4
E. Control	4	-	-	-	-	-	4
Total	10	3	4	1	2	-	20

Cuadro 8. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 3er y 4to día de retiro.

Tratamientos	Tamaño de halo de inhibición (mm)						Total
	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	
A. Profiláctico, agua	4	-	-	-	-	-	4
B. Terapéutico, agua	3	1	-	-	-	-	4
C. Profiláctico, alimento	4	-	-	-	-	-	4
D. Terapéutico, alimento y agua	1	3	1	-	-	-	5
E. Control	4	-	-	-	-	-	4
Total	16	4	1	-	-	-	21

Cuadro 9. Tamaño del halo de inhibición (mm) de las muestras durante el 5to y 6to día de retiro.

Tratamientos	Tamaño de halo de inhibición (mm)						Total
	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	
A. Profiláctico, agua	4	-	-	-	-	-	4
B. Terapéutico, agua	5	-	-	-	-	-	5
C. Profiláctico, alimento	4	-	-	-	-	-	4
D. Terapéutico, alimento y agua	5	-	-	-	-	-	5
E. Control	4	-	-	-	-	-	4
Total	22	-	-	-	-	-	22

Cuadro 10. Número de muestras examinadas para la presencia de residuos de oxitetraciclina.

Tratamientos	Nº Muestras Examinadas	Nº Muestras Positivas	Positivos %	Nº Muestras Negativas	Negativos %
A	46	7	15.22	39	84.78
B	55	16	29.10	39	70.90
C	44	3	6.82	41	93.18
D	57	26	45.61	31	54.39
E	47	0	0	47	100
Total	249	52		197	

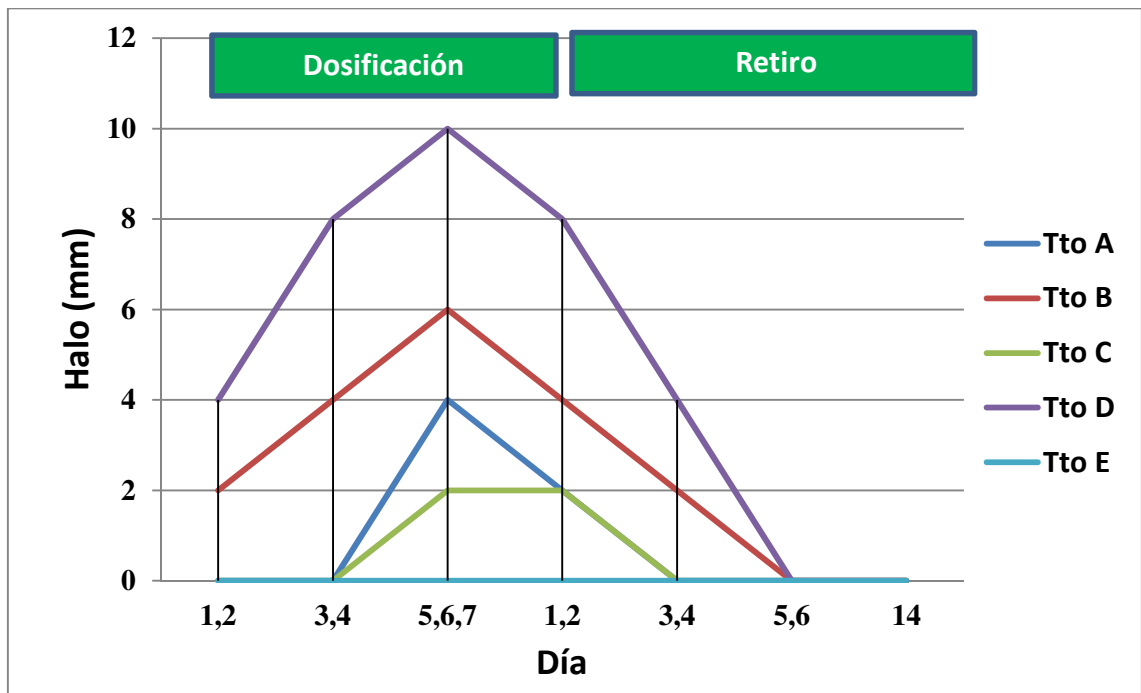


Figura 15. Patrón de residuos de oxitetraciclina en las muestras

VII. DISCUSION

Actualmente se utilizan medicamentos de uso veterinario con fines no solo terapéuticos, sino también en gran medida profilácticos, llevados a cabo con la finalidad de prevenir la aparición de problemas infecciosos.

En este camino el uso masivo e indiscriminado de antibióticos trae consigo consecuencias negativas como es la generación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos y la presencia de residuos en los productos destinados al consumo humano, especialmente en: leche, carne y huevo, arrastrando consigo serios problemas en la salud pública (Pérez, 2005), entre los cuales se mencionan problemas de toxicidad (Parra *et al.*, 2003), reacciones de hipersensibilidad (Riedl y Casillas, 2003) y efectos carcinogénicos entre otros, haciéndose necesaria la implementación de programas de monitoreo y control de residuos, asegurando de esta forma la inocuidad en los alimentos.

Al buscar bibliografía sobre el tema, se hace muy evidente que gran parte de los estudios de antibióticos presentes en los alimentos se realizaron en leche y esto se debe principalmente a un interés netamente económico debido a que la presencia de antibióticos en leche es un factor que afecta la tecnología alimentaria, interfiriendo con el crecimiento de cultivos iniciadores que se utilizan en la fabricación de yogurt, requesón y otros quesos. Sin embargo existe también la necesidad de realizar estudios en otros productos pecuarios de importancia en la alimentación y nutrición humana, en este caso el huevo.

En este contexto el presente estudio evaluó la presencia residual de antibióticos en huevos de aves dosificadas en forma profiláctica y terapéutica, así como en el agua de bebida y alimento. El antibiótico elegido para el estudio fue la oxitetraciclina, el cual es utilizado actualmente con la finalidad de mejorar la producción de huevos y aumentar la eficiencia alimentaria, además de prevenir enfermedades en aves reproductoras y cárnicas.

Si bien los métodos cromatográficos (HPLC, GC, TLC, etc.) son considerados los métodos de confirmación por excelencia, estos presentan el inconveniente de no poder analizar grandes volúmenes de muestras en tiempo reducido (Pastor-Navarro *et al.*, 2007), además del elevado precio que supone su implementación y manejo. Por lo tanto, en el presente estudio se hizo uso de un método microbiológico cualitativo el cual no pretende más que indicar la presencia o ausencia de algún inhibidor bacteriano, siendo más eficaz en términos de practicidad.

En base a lo mencionado anteriormente, se destaca el estudio como medio de apoyo, a la hora de evaluar e implementar programas de control de residuos antibióticos en huevos, evitando y/o atenuando consecuentemente los riesgos de salud que implican su aparición residual para la salud humana.

En cuanto al desarrollo del estudio, se observó ausencia de residuos antibióticos en las aves sometidas al periodo de pre – dosificación, lo cual indica, que las aves adquiridas para el experimento no habrían sido tratadas previamente o en todo caso el periodo de aclimatación y acondicionamiento que se les brindó a las aves antes del inicio del estudio, permitió eliminar o en todo caso disminuir su presencia residual antibiótica de tal forma que no pudo ser evidenciada por la prueba.

Una vez iniciado el periodo de dosificación en las aves, se encontró diferencia en la medida de los halos de inhibición entre tratamientos ($p < 0.05$) a partir del 3er y 4to día de dosificación y se prolongó hasta el 3er y 4to día de retiro, dentro del cual se identificó al tratamiento terapéutico en alimento y agua por ser el grupo en el cual los residuos presentaron un mayor tamaño de halo de inhibición, además de mostrar niveles residuales de oxitetraciclina en un menor tiempo y con mayor persistencia. Esto

demuestra probablemente que la mayor dosis utilizada en los tratamientos, hizo posible que la droga alcance con mayor rapidez y cantidad el torrente sanguíneo, obteniéndose de esta forma niveles plasmáticos constantes de la droga, con su consiguiente diseminación hacia todo el organismo, el cual en aves de postura se incluyen los ovario con folículos en crecimiento y el oviducto donde el huevo es formado y secretado. Los residuos de drogas en huevos son un reflejo de sus niveles plasmáticos, los cuales pueden mostrar un nivel constante mientras el plasma lo haga (Kan y Petz, 2000).

Donoghue *et al.* (1997) menciona que a pesar de que el tiempo de vida plasmática de la droga ejerce un rol importante, hay que tener en cuenta el efecto que desempeña la naturaleza del tejido en la disposición de la droga. En el caso de las aves de postura, el proceso dinámico en la formación de la yema influencia significativamente la incorporación y depósito de residuos en el huevo. Es probable que residuos sean incorporados durante el periodo de dosificación y almacenados en folículos preovulatorios por un número de días antes de la ovulación y formación del huevo. Esto explica en parte el hecho que se detecten niveles residuales de oxitetraciclina una vez finalizados los tratamientos.

En lo que respecta al tratamiento control, se identificó ausencia de niveles residuales de oxitetraciclina durante el transcurso del experimento (Figura 14), lo cual se relaciona directamente con la alimentación libre de antibiótico que recibieron las aves. Asimismo, se descarta la presencia de halos de inhibición inespecíficos producidos por cualquier sustancia con actividad antimicrobiana evitándose de esta forma la presencia de reacciones falsas positivas.

En cuanto a los inconvenientes sufridos durante el transcurso del experimento, tenemos que mencionar el número de huevos muestreados. Inicialmente se pensó obtener un huevo diario por ave para el muestreo, sumando un total de 20 huevos por día, sin embargo, los huevos recogidos estuvieron por debajo de esa cifra obteniéndose 13 huevos por día en promedio durante el periodo de dosificación y 10 huevos durante el periodo de retiro. La razón a esta merma en la obtención de huevos está reflejada en un número importante de huevos que aparecían rotos en las jaulas a la recolección (observándose en algunas aves el vicio de picar huevos). Por lo tanto se hizo necesario

la agrupación de muestras cada dos días y en un caso de tres días con la finalidad de conseguir una cantidad de muestras conveniente para la evaluación.

Por último, durante el transcurso de la metodología se determinó variar la forma de colocación de la muestra de pocillos a hisopos debido a una mejor adaptación y manejo de la muestra.

VI. CONCLUSIONES

a) Evaluando los perfiles de positividad y diámetros de halo de inhibición, se puede notar claramente la naturaleza de los tratamientos. Aquellos grupos a los que se le brindo oxitetraciclina en mayor dosis presentaron un mayor porcentaje de positivos, así como un mayor tamaño de halo de inhibición. Adicionalmente se pudo evidenciar en estos su aparición residual más temprana y su mayor persistencia.

b) Se observó diferencia estadística significativa entre tratamientos en términos de halo de inhibición ($p < 0.05$) a partir del 3er y 4to día de dosificación y se prolongó hasta el 3er y 4to día del periodo de retiro.

c) En lo que refiere al método de detección, la prueba microbiológica representa una alternativa para la evaluación de residuos antibióticos en huevos.

VII. RECOMENDACIONES

a) Realizar estudios sobre la presencia residual de antibióticos en clara y yema por separado, toda vez que podría existir un efecto dilutorio de residuos de una estructura a otra.

b) Utilizar métodos cuantitativos confirmatorios para la evaluación de residuos antibióticos en huevos, con la finalidad de obtener resultados más certeros y poder realizar comparaciones entre métodos.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Aerts, M. M. L.; A. C. Hogenboom; U. A. Brinkman. 1995. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *J. Chromatogr.* 667: 1-20.
2. Aga, D. S.; S. O'Connor; S. Ensley; J. O. Payero; D. Snow; D. Tarkalson. 2005. Determination of the persistence of Tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using Enzyme Linked Immunosorbent Assay and liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7165-7171.
3. Alfredsson, G.; C. Branzell; K. Granelli; Å. Lundström. 2005. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. *Anal. Chim. Acta.* 529: 47-51.
4. Amsterdam, A. 1996. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. In: Lorian, V. (ed.) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams & Wilkins, MA, USA, pp. 52-111.
5. Anhalt, G. 1977. Physiologie der eientstehung und einlagerung antibakterieller wirkstoffe. *Arch. Gefluegelk.* 41: 232-237.
6. Anon. 1989. United States Department of Agriculture Nutrition Information Service: Handbook No. 8, Supplement.

7. Awade, A. 1996. On egg fractionation: Applications of liquid chromatography to the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins. *Z. Lebensm Unters Forsch A* 202: 1-14.
8. Barry, A. L. 1976. Agar diffusion: general considerations. In: Barry, A. L. (ed.) *The antimicrobial susceptibility test: principles and practices*. Philadelphia. Lea & Febiger, PA, USA, pp. 163-179.
9. Barry, A. L.; L. J. Effinger. 1974. Performance of Mueller-Hinton agars prepared by three manufacturers. *J. Am. Clin. Pathol.* 62: 113-117.
10. Bentley, O. E. 1983. Comparative efficacy of neomycin and oxytetracycline alone and in combination against concurrent salmonellosis and pasteurellosis in swine. *Veterinary Medicine/ Small animal clinician*, March. 409-414.
11. Berdy, J. 1974. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.* 18: 309-406.
12. Bertrand, K.; K. Postle; L. V. Wray; W. S. Reznikof. 1984. Construction of a single-copy promoter vector and its use in analysis of regulation of the transposon Tn10 tetracycline resistance determinant. *J. Bacteriol.* 158: 910-919.
13. Beuchat, L. R.; D. A. Golden. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 1989m: 134-142.
14. Bielecka, M.; J. D. Baldock; A. W. Kotula. 1981. Determination of antibiotics in meat using *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Food Prot.* 44: 194-200.
15. Blom, L. 1975. Plasma half-lives and the excretion into egg-white and yolk of three sulphonamides and pyrimethamine after medication of laying hens. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 37: 79-93.

16. Bogaerts, R.; F. Wolf. 1980. A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtsch.* 60: 672-674.
17. Braham, R.; W. D. Black; J. Claxton; A. J. Yee. 2001. A rapid assay for detecting sulfonamides in tissues of slaughtered animals. *J. Food Prot.* 64: 1565-1573.
18. Brock, T.; M. Madigan; J. Martinko; J. Parker. 1999. *Biology of microorganisms*. 6th edition, USA. Prentice-Hall Inc.
19. Broek, P. 1989. Antimicrobial drug, microorganism and phagocytes. *Rev Infect Dis* 2: 213-8.
20. Bugyei, K.; W. Black; S. McEwen; A. H. Meek. 1994. Detecting oxytetracycline residues in chicken tissues using the Delvotest P system. *J. Food Prot.* 57: 141-145.
21. Burrington, K. J. 2000. Nutritional and beneficial ingredients. *Food Product Design* 38.
22. Buyeske, D. A.; H. J. Eisner; R. G. Kelly. 1960. Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 130: 150-156.
23. Calderwood, S.; D. Moellering. 1988. Principios de tratamiento antiinfeccioso. En: Stein LH. *Medicina interna*. 2 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1469-86.
24. Calnek, B. W.; H. J. Barnes; C. Beard; L. McDougald; Y. M. Saif. 1997. *Enfermedades de las aves*. Iowa State University Press. Ames, Iowa, 50014. 181-189.

25. Cancho Grande, B.; M. S. García; J. Simal. 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva Actual. Cienc. Tecnol. Aliment. Vol. 3, No. 1, pp. 39-47.
26. Cholas, G. 1976. Withdrawal times and limitations for use of animal drugs and certifiable antibiotics used in food-producing animals. Southwest. Vet. 29: 144-158.
27. Chopra, I.; K. Hacker; Z. Misulovin; D. M. Rothstein. 1990. Sensitive biological detection method for tetracyclines using a *tetA-lacZ* fusion system. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 111-116.
28. Cisneros, E.; M. Gómez. 1987. Tránsito y resistencia al suero en cepas gramnegativas multiresistentes a las drogas antimicrobianas. Rev. Latinoa. Microbiol: 29-27.
29. Codex Alimentarius. 1993. Directrices para el establecimiento de un programa reglamentario para el control de residuos veterinarios en el alimento. CAC/GL 16. Pag. 1-43.
30. Commission Regulation (EC) No 281/96. 1996. Amending Annexes I and III to Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (Text with EEA relevance) (OJ L37, 15.02.1996, p.3).
31. Cooper, K. E. 1972. The theory of antibiotic diffusion zones. Kavanagh, F. W. (ed.) Analytical Microbiology, Vol. II. Academic Press, New York, NY, USA, pp. 13-30.
32. Cordiés, L.; A. Vásquez. 1990. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Revisión bibliográfica. Rev Acta Médica 4(2):165-92.

33. Couvalin, A. J. 1988. El final de la edad de oro de los antibióticos. *Ther Nat* 1988; 314(3): 50-2.
34. Croubles, S.; K. Baert; L. Okerman; V. Robbrecht; L. Aerden; P. De Backer. 1999. The detection of residues of doxycycline in porcine kidney and muscle tissue: correlation between results of microbiological screening and confirmation tests. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 68: 22- 26.
35. Currie, D.; L. Lynas; D. G. Kennedy; J. McCaughey. 1998. Evaluation of a modified EC four plate method to detect antimicrobial drugs. *Food Addit. Contam.* 15: 651-660.
36. Davis, C.; R. Reeves. 2002. High value opportunities from the chicken egg. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No 02/094. Project No DAQ-275A.
37. Dayan, A. D. 1993. Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. *Vet. Microbiol.* 35: 213-226.
38. Dewdney, J.; L. Maes; J. Raynaud; F. Blanc; J. Scheid; T. Jackson; S. Lens; C. Verschuere. 1991. Risk assessment of antibiotic residues of b-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chem. Toxic.* 29: 477-483.
39. De Zutter, L.; K. Koenen-Dierick; J. Van Hoof. 1985. Detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. II. Sensitivity of some detection methods to different antibiotics. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 54: 445-454.
40. Dipeolu, M. A.; D. Eruvbetine; E. B. Oguntona; O. O. Bankole; K. S. Sowunmi. 2005. Comparison of effects of antibiotics and enzyme inclusion in diets of laying birds. *Arch. Zootec.* 54: 3-11.

41. Dixon-Holland, D. E. 1992. ELISA and its applications for residue analysis of antibiotics and drugs in products of animal origin. In: Agarwal, V. K. (ed.) Analysis of Antibiotic Drug Residues in Food Products of Animal Origin. Plenum Press, New York, USA, pp. 57-74.
42. Donoghue, D. J.; H. Hairston; C. V. Cope; M. J. Bartholomew; D. D. Wagner. 1994. Incurred arsenic residues in chicken eggs. J. Food Prot. 57: 218–223.
43. Donoghue, D. J.; H. Hairston; S. Gaines; M. J. Bartholomew; A. Donoghue. 1996. Modeling residue uptake in eggs: 1 similar drug residue patterns in developing yolks following injection with ampicillin or oxytetracycline. Poultry Sci. 75: 321–328.
44. Donoghue, D. J.; H. Hairston; M. Henderson; M. McDonald; S. Gaines; A. Donoghue. 1997. Modeling drug residue uptake by eggs: Yolks contain ampicillin residues even after Drug withdrawal and nondetectability in the plasma. Poultry Sci. 76: 458–462.
45. Dorsey, T.A.; G. S. Harshfield. 1959. Studies on control of fowl cholera. South Dakota State. Univ. Agric. Exp. Stn. Bull. 23: 1-18.
46. El Korchi, G. 2006. Farmacocinética y eficacia de Oxitetraciclina tras su administración intramuscular en bovino. Depleción tisular. Facultad de Veterinaria. Univ. Autónoma de Barcelona. 171 p.
47. EMEA/CVMP/023/95.1995.Oxitetracycline,Tetracycline, Chlortetracycline. Summary Report (1) (2) (3).
48. Erasmuson, A. F.; E. R. Cairns; B. O. O’Kane. 1998. Bicarbonate as an interference in *B. stearrowthermophilus* assays. Analyst 123: 2497- 2499.
49. Errecalde, J. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. FAO. producción y sanidad animal. ISBN 92-5-905: 150-7.

50. Escolar, M.; J. Azanza; B. Sádaba; J. Honorato. 1998. Tetraciclinas, cloranfenicol y fosfomicina. *Medicine* 1998; 7(76): 3524-3532.
51. Fabre, J.; E. Miles; P. Kalfopoulos; G. Merier. 1971. The kinetics of tetracyclines in man. II. Excretion, penetration in normal and inflammatory tissues, behavior in renal insufficiency and hemodialysis. *Schweiz-Med Wochenschr*; 101(18): 625-633.
52. Falder, A. 2005. Huevos. *Enciclopedia de los alimentos. Distribución y Consumo* 105-115.
53. Fein, S. B.; J. Lin; A. S. Levy. 1995. Foodborne illness: perception, experience, and preventive behavior in the United States. *J. Food Prot.* 58: 1405-1411.
54. Fernández Suárez, A. 2003. Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal. *Énfasis alimentación. Año IX, N°1 febrero-marzo* 40-47.
55. Ferrini, A. M.; V. Mannoni; P. Aureli. 1997. The combined plates microbial assay (CPMA) for the detection of β -lactam, sulfonamide, streptomycin and tetracycline residues in meat. *Arch. Lebensmittelhyg.* 48: 133-135.
56. Fortt, A.; F. Cabello; A. Buschmann. 2006. Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. *Rev. Chil. Infect.* 2007; 24 (1): 14-18.
57. Franke, E. L.; H. C. Neu. 1987. Tetracyclines. *Med Clin North Am*; 3: 1221-36.
58. Frost, P.; G. Weinstein; E. Gómez. 1972. Phototoxic potential of minocycline and doxycycline. *Arch Dermatol*; 105: 681.
59. Gibson, R.; M. Makrides; J. Hawkes. 1998. Eggs as a source of essential docosahexaenoic acid (DHA) in the diets of weaning infants. RIRDC Project No. UF-1^a.

60. Gómez, J.; A. Mosqueda; L. Ocampo. 1991. *Terapéutica Avícola*. 2da. Ed. UNAM. México.
61. González Silvano, S. 1995. Antibióticos. En: Silvestre, A. A. *Toxicología de los alimentos*, Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 391-398.
62. Grausgruber, W.; R. Kissling. 1964. Influence of antibiotic food supplements on bacteriological and serological diagnosis of pullorum disease. *Wien. Tierärztl. Monatsschr.* 51: 814-822.
63. Greenwood, D. 1992. Antibiotic: modes of action. En: Lambert H, O'grady P. *Antibiotic and chemotherapy*. 6 ed. Londres. Churchill Livingstone. 291-302.
64. Grossman, E. R.; A. Walchek; H. Freedman. 1971. Tetracyclines and permanent teeth. The relation between dose and tooth color. *Pediatrics*. 47(3): 567-570.
65. Haagsma, N.; M. J. Mengelers. 1989. A rapid fluorimetric screening method for chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline in pig meat and kidney tissues. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188: 227-231.
66. Hafez, H. M. 1991. Factors influencing Drug Residues in Poultry Products: A review. *Arch. Geflügelk.* 55: 193-195.
67. Hart, C. A. 1998. La resistencia a los antibióticos. ¿Un problema creciente? *Br. Med. J (Ed Latinoam)* 1998; 6: 147-8.
68. Hasler, C. M. 2000. The changing face of functional foods. *Journal of the American College of Nutrition* 19(5): 499-506.
69. Heinert, H.; G. Van Der Wall; H. Brehmer. 1976. Lysozym-Ursache von unspezifischen Reaktionen im mikrobiologischen Hemmstofftest. *Arch. Lebensmittelhyg.* 27: 55-60.

70. Ilender. 1999. La lucha Antiinfecciosa: Los antibióticos. Notas científicas Nro. 1.
71. Ilender. 2000. La lucha Antiinfecciosa: Resistencia a los antibióticos. Notas científicas Nro. 1.
72. Instituto de Estudios del Huevo e INPROVO. 2002. El Libro del Huevo. Disponible: http://www.informacionconsumidor.com/desktopmodules/xsdocumentmanagementadmin//App_FileUploads/10_libro_huevo.pdf
73. Instituto de Estudios del Huevo. 2004. Seguridad alimentaria en huevos y ovoproductos. Disponible en: www.institutohuevo.com
74. Jackson, G. 1980. Safety assessment of drug residues. J. Am. Vet. Med. Assoc. 176: 1141-1144.
75. Johnston, R. W.; R. H. Reamer; E. W. Harris; H. G. Fugate. 1981. A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. J. Food Prot. 44: 828-831.
76. Kan, C. A.; J. G. Jacobs. 1998. Bepalen van de verdelingscoefficient van een aantal sulfonamiden over water/organisch oplosmiddel, alsmede de verdeling over dooier/wit na toediening via voer aan leghennen; ID-DLO Internal Report 98.001, 37 pp.
77. Kan, C. A.; H. J. Keukens; W. M. J. Beek. 1996. Experimentally induced dimetridazole residues in eggs. Pages 586–590 *in*: Euroresidue III Conference on residues of veterinary drugs in food. N. Haagsma, and A. Ruiter, ed. Utrecht University, Faculty of Medicine, Utrecht, The Netherlands.
78. Kan, C.; M. Petz. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. Journal of agricultural and food chemistry, 48: 6397-6403.

79. Katz, S. E.; C. A. Fassbender. 1972. Improved procedures for the determination of residues of tetracycline in milk, milk products, chicken, muscle, liver and eggs. *Bulletin for Environmental Contamination and Toxicology*. 8: 229-236.
80. Kennedy, D. G.; R. J. McCracken; A. Cannavan; S. A. Hewitt. 1998. Use of liquid chromatography - mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *J. Chromatogr.* 812: 77-98.
81. Keukens, H. J.; C. A. Kan; M. J. H. Tomassen. 1996. Study on the presence of olaquinox residues in eggs after administration of feeds with low levels of olaquinox to laying hens. Pages 611–615 *in: Euroresidue III Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*. N. Haagsma, and A. Ruiter, ed. Utrecht University, Faculty of Medicine, Utrecht, The Netherlands.
82. Koenen-Dierick, K.; J. O. De Beer. 1998. Optimization of an antibiotic residue screening test, based on inhibition of *Bacillus subtilis* BGA, with experimental design. *Food Addit. Contam.* 15: 528-534.
83. Koenen-Dierick, K.; L. Okerman; L. De Zutter; J. M. Degroodt; J. Van Hoof; S. Srebrink. 1995. A one plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method *Food Addit. Contam.* 12, 77-82.
84. Kondo, F.; C. E. Tsai; E. Hamada; S-Y. Lin; K. Saitanu. 1993. A continuous, simple and rapid method for the detection, extraction and identification of residual antibacterial agents in meat. *Microbios* 73: 237- 247.
85. Korpela, M. T.; J. S. Kurittu; J. T. Karvinen; M. T. Karp. 1998. A recombinant *Escherichia coli* sensor strain for the detection of tetracyclines. *Anal. Chem.* 70: 4457-4462.

86. Korsrud, G.; J. D. MacNeil. 1988. Evaluation of the swab test on premises, the calf antibiotic and sulfa test, and a microbial inhibitor test with standard solutions of 22 antibiotics. *J. Food Prot.* 51: 43-46.
87. Korsrud, G. O.; C. D. C. Salisbury; C. S. Rhodes; M. G. Papich; W. D. G. Yates; W. S. Bulmer; J. D. MacNeil; D. A. Landry; G. Lambert; M. S. Yong; L. Ritters. 1998. Depletion of penicillin G residues in tissues, plasma, and injection sites of market pigs injected intramuscularly with procaine penicillin G. *Food Addit. Contam.* 15: 421-426.
88. Kühne, M.; S. Wegmann; A. Kobe; R. Fries. 2000. Tetracycline residues in bones of slaughtered animals. *Food Control* 11: 175-180.
89. Lanosa, R. 1997. Enfoque diagnóstico del paciente séptico. *Arch. Med. Int.* 1997.
90. LeBlanc, A.; J. E. Perry. 1967. Transfer of tetracycline across the human placenta. *Texas Rep Biol Med* 25: 541.
91. Levy, S. 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* 278 (3): 46-53.
92. Lloyd, D.; D. Van Der Merwe. 1987. The use of a diffusion test for the detection of antibiotics in the tissues of slaughter stock. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 58: 183-186.
93. Lohajová, L.; J. Nagy; P. Popelka. 2004, In vitro studies for the application of the Premi®Test for the detection of antibiotic residues in chicken eggs - short communication, *Nutrition*, 28: 503-05.
94. MAF. 2001. Decree on microbiological detection of antimicrobial drugs in meat inspection. 21/EEO/2001.

95. Martinez, M. 1998. Use of Pharmacokinetics in Veterinary Medicine. III: Physicochemical Properties of Pharmaceuticals. J. Am. Vet. Med. Assoc. 213: 1274-1277.
96. McCracken, R. J.; D. E. Spence; D. G. Kennedy. 2000. Comparison of extraction techniques for the recovery of veterinary drug residues from animal tissues. Food Addit. Contam. 17: 907-914.
97. Merle, A.; A. Mandell; G. Mandell. 1991. Agentes antimicrobianos, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y agentes antimicrobianos varios, en: las bases farmacológicas de la terapéutica (M. Panamericana, ed), México Df . pp 1083 - 1109.
98. Münstedt, T.; E. Rademacher; M. Petz. 2005. HPLC, Charm II and ELISA: Advantages and disadvantages for the analysis of tetracyclines in honey. Apiacta 40: 5-9.
99. Myllyniemi, A. L. 2004. Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria. Univ. de Helsinki. Helsinki. 87 p.
100. Neu, H. 1987. Conceptos generales sobre quimioterapia de enfermedades infecciosas. Clin Med North Am 71: 1115.
101. Niessen, W. M. A.; A. P. Tinke. 1995. Liquid chromatography – mass spectrometry. General principles and instrumentation. J. Chromatogr. A. 703: 37-57.
102. Nouws, J. F. 1979. Techniques de dosage des residus d'antibiotiques et methodes de fixation des delais d'attente. Revue. Méd. Vét. 130: 1193- 1206.
103. Nouws, J. F. M.; N. J. G. Broex; J. M. P. Den Hartog; F. Driessens. 1988. The New Dutch Kidney Test. Arch. Lebensmittelhyg. 39: 133-156.

104. Nouws, J. F.; T. B. Vree. 1983. Effect of injection site on the bioavailability of an oxytetracycline formulation in ruminal calves. *Vet Quarterly*. 5(4): 165-170.
105. Nouws, J.; G. Ziv. 1978. Pre-slaughter withdrawal times for drugs in dairy cows. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1: 47-56.
106. Nys, Y.; M. T. Hincke; J. L. Arias; J. M. García-Ruiz; T. Solomon. 1999. Avian egg shell mineralization. *Poultry and Avian Biology Reviews*. 10: 143-166.
107. Oka, A.; Y. Ito; H. Matsumoto. 2000. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr. A* 882: 109-133.
108. Okerman, L.; S. Croubles; S. De Baere; J. Van Hoof; P. De Backer; H. De Brabander. 2001. Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat. *Food Addit. Contam.* 18: 385-393.
109. Okerman, L.; J. Van Hoof; W. Debeuckelaere. 1998. Evaluation of the European Four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *J. AOAC. Int.* 81, 51-56.
110. Okerman, L.; K. De Wasch; J. Van Hoof; W. Smedts. 2003. Simultaneous determination of different antibiotic residues in bovine and in porcine kidneys by solid-phase fluorescence immunoassay. *J AOAC Int.* 86: 236-240.
111. O.M.S. 1993. Evaluación de ciertos residuos de fármacos en alimentos. Serie de informes técnicos 832. 40º Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.
112. Paige, J. C.; L. Tollefson; M. Miller. 1997. Public health impact on drug residues in animal tissues. *Vet. Human Toxicol.* 39: 162-169.

113. Pastor-Navarro, N.; E. Gallego-Iglesias; A. Maquieira; R. Puchades. 2006. Immunochemical method for sulfasalazine determination in human plasma. *Anal. Chim. Act.*, doi: 10.1016/j.aca.2006.10.028.
114. Pastor-Navarro, N.; Á. Maquieira; R. Puchades. 2007. Nuevos inmunoensayos para el análisis de residuos de tetraciclinas en mieles. *CTC Alimentación*. Nº 32.
115. Parra, M.; L. Suarez; J. Londoño; N. Perez; G. Rengifo. 2003. Los residuos de medicamentos en la leche. Problemática y estrategias para su control. *Manual Técnico*. Código 2-1-10-06-02-03. ISBN.
116. Pérez, J. 2005. Ensayos de familiarización en la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas en músculo esquelético animal por el método de las cuatro placas. Tesina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Carrera de Licenciatura en Tecnología de alimentos. Univ. de Belgrano. Buenos Aires. 44 p.
117. Petkovska, E.; R. Slaveska-Raicki; V. Rafajlovska. 2006. Determination of tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline in milk by TLC and column chromatography using Amberlite XAD-2. *Chemia Analityczna* 51: 275-283.
118. Powrie, W.; S. Nakai. 1986. In: *Egg Science and Technology*. Stadelman WJ and Cotterill OJ (Eds.) MacMillan, London.
119. Reglamento CE. 2377/90. 1990. Procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.
120. Residue Guideline. 2004. Rutas de Administración. *Residues in Poultry Tissues and Eggs*. No. 31.
121. Real Decreto 640/2006. 2006. Aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado*. (núm. 126).

122. Riedl, M. A.; A. M. Casillas. 2003. Adverse drug reactions: types and treatment options. *Am. Fam. Physician.* 68: 1781-1790.
123. Rodríguez, M.; J. González; J. Barreto; N. Lim; A. Areu; A. Pardo. 1998. Tetraciclinas. *Acta Médica.* 8(1): 75-9.
124. Roudaut, B.; J. P. Moretain; J. Boisseau. 1987. Excretion of oxytetracycline in eggs after medication of laying hens. *Food Addit. Contam.* 4: 297-307.
125. Roudaut, B.; J. P. Moretain; J. Boisseau. 1989. Excretion of tetracycline and chlortetracycline in eggs after oral medication of laying hens. *Food Addit. Contam.* 6: 71-78.
126. Ruz, N.; M. Zabala; M. G. Kramer; M. A. Campanero; M. C. Dios-Viéitez; M. J. Blanco-Príeto. 2004. Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography: Application to particulate drug delivery systems. *J. Chromatogr. A* 1031: 295-301.
127. Salehzadeh, F.; R. Madani; A. Salehzadeh; N. Rokni; F. Golchinefar. 2006. Oxytetracycline residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. *Pakistan Journal of Nutrition* 5 (4): 377-381.
128. Sande, M.; G. Mandell. 1982. Quimioterapia de las enfermedades: agentes antimicrobianos. En: Goodman Gilman A, Goodman LS. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* La Habana:Editorial Científico- Técnica.
129. San Martin, B.; H. Cañon. 2000. Métodos de análisis para el control de residuos químicos en productos de origen animal. Departamento de Ciencias Clínicas Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile. Año 6 N°2.
130. Schoevers, E. J.; M. Terlou; A. Pijpers; J. H. M. Verheijden. 1994. An image analysis system: an objective and accurate alternative for reading the agar diffusion test. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 17: 38-42.

131. Shils, M. E. 1963. Renal disease and the metabolic effects of tetracycline. *Ann. Intern. Med.* 58: 389-408.
132. Stipkovits, L.; J. Marca; L. Sisquella; E. Navarrete. 2001. Administración de un inmunoterápico oral para incrementar la eficacia del tratamiento con tetraciclinas en pollos infectados experimentalmente con micoplasma *Gallisepticum*. XXXVIII Symposium Científico de Avicultura.
133. Sundlof, S. F. 1994. Human risks associated with drug residues in animal derived foods. *J. Agromed.* 1: 5-22.
134. Sungino, H.; T. Nitoda; L. Juneja. 1997. General chemical composition of hen eggs. In: *Hen eggs: Their basic and applied science*. Yammamoti T, Juneja LR, Hatta H and Kim M (Eds). CRC Press.
135. Taylor, M.; P. Reide. 2001. *Lo esencial en Farmacología*. Mosby Internacional Ltd. Edición en español. Ediciones Harcourt, S. A. Madrid, España.
136. Terhune, T. N.; D. W. Upson. 1989. Factors affecting the accuracy of the live animal swab test for detecting urine oxytetracycline and predicting oxytetracycline residues in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194: 918-921.
137. Tritschler, J. P.; R. T. Duby; S. P. Oliver; R. W. Prange. 1987. Microbiological screening tests to detect antibiotic residues in cull dairy cows. *J. Food Prot.* 50: 97-102.
138. Trolldenier, H. 1980. Antibióticos en Medicina veterinaria. Zaragoza: Editorial Acribia, : 33-44, 95-98, 108, 109, 115-118, 124, 206-208.
139. USDA. 1979. United States Department of Agriculture. *A self Instructional Guide: Performing the Swab Test (On Premises) for Antibiotic Residues*. Food Safety and Quality Service. Washington, D. C., USA.

140. USDA. 1983. United States Department of Agriculture. How to perform the Live Animal Swab Test for antibiotic residues. USDA, Handbook No. 601, Washington, D. C., USA.

141. USDA. 1984. United States Department of Agriculture. Performing the Calf Antibiotic and Sulfa Test. A Self-Instructional Guide, Food Safety and Inspection Service, Washington, D. C., USA.

142. Van Schothorst, M.; G. Peelen-Knol. 1970. Detection and identification of some antibiotics in slaughter animals. *Neth. J. Vet. Sci.* 3: 85-93.

143. Whelton, A. 1978. Tetracyclines in renal insufficiency: Resolution of a therapeutic dilemma. *Bull NY Acad Med*; 54: 223.

144. Warner, T.; S. Harris. 2000. *Ehrlichiosis Monocitica Canina*. In: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, L. Carmichael (Ed.). Disponible en: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/waner_es/ivis.pdf.

145. Williams, K. C.; B. J. Blaney; H. Mahwinney. 1992. Bacterial inhibitory residues in pigs fed mouldy grain. *Aust. Vet. J.* 69: 38-39.

146. Yoshimura, H.; N. Osawa; F. S. Rasa; D. Hermawati; S. Werdiningsih; N. M. Isriyanthi; T. Sugimoti. 1991. Residues of doxycycline and oxytetracycline in eggs after medication via drinking water to laying hens. *Feed Add. Cont.* 8: 65–69.

147. Zurgelle, G.; M. Petz; E. Mueller-Seitz; E. Siewert. 2000. Metabolites of Oxytetracycline, Tetracycline, and Chlortetracycline and Their Distribution in Egg White, Egg Yolk, and Hen Plasma. *J. Agric. Food Chem.* 48: 6392-6.

X. APENDICE

APENDICE 1. Periodo de retiro para fármacos antimicrobianos de uso avícola

PERIODO DE RETIRO PARA FARMACOS ANTIMICROBIANOS DE USO AVÍCOLA			
Fármaco	Administración vía alimento	Administración vía agua de bebida	Administración vía parenteral
Acido nalidixico		20 días	30 días
Acido oxolínico		3 días	3 días
Ampicilina		15 días	30 días
Amoxicilina		2 días	2 días
Josamicina		5 días	5 días
Apramicina			15 días
Bacitracina	ningún día		
Ceftiofur			5 días
Cloranfenicol *		30 días	30 días
Clortetraciclina	5 días	30 días	30 días
Colistina		5 días	5 días
Danofloxacina		5 días	5 días
Dihidroestreptomicina			30 días
Enrofloxacina		5 días	5 días
Eritromicina **	2 días	30 días	30 días
Espectinomicina		5 días	5 días
Espiramicina		6 días	6 días
Estreptomicina			30 días
Flumequina		1 día	1 día
Furaltadona		5 días	7 días
Furazolidona	5 días		
Gentamicina			20 días 63 días +
Kanamicina			15 días
Kitasamicina	2 días	2 días	
Lincomicina+	ningún día		5 días
Neomicina	5 a 14 días	5 días pollo de engorda 14 días en ponedoras	15 a 20 días
Nistatina	ningún día		
Nitrofurazona	5 días	5 días	
Novobiocina+	4 días		
Oxitetraciclina*	3 a 5 días	30 días	30 días
Sulfaquinoxalina	10 días	5 a 10 días	
Sulfamonometoxina	5 días	15 días	15 días
Sulfacloropiridazina	5 días	5 días	
Sulfadoxina	5 días	5 días	
Sulfadimetoxina	5 días	5 días	
Sulfadiazina		5 días	5 días
Sulfamerazina		5 días	5 días
Sulfas + trimetoprim		5 días	5 días
Tiamulina	5 días	5 días	5 días
Tilosina		5 días	5 días

Fuente: Gómez, J.; A. Mosqueda; L. Ocampo. 1991. Terapéutica Avícola. 2da. Ed. UNAM. México.

APENDICE 2. Lista de sustancias farmacológicamente activas cuyo LMR se han establecido. Reglamento del Consejo Europeo 2758/99 (Modificación del 23.12.99 del R2377/90)

Sustancia farmacológicamente activa	Especie animal	Límite máximo residual (µg/Kg) / Tejidos diana
QUIMIOTERAPÉUTICOS		
Sulfonamidas		
Todas las sustancias de este grupo	Todas las especies productoras de alimentos Bovinos, ovinos, caprinos	100 /músculo, grasa, hígado, riñón 100 /leche
Derivados de la diaminopirimidina		
Baquiloprim	Bovinos	10 /grasa; 30 /leche; 150 /riñón; 300 /hígado
	Porcinos	40 /piel más grasa; 50 /hígado, riñón
Trimetoprim	Bovinos	50 /músculo, grasa, hígado, riñón, leche
	Porcinos	50 /músculo, piel más grasa, hígado, riñón
	Équidos	100 /músculo, grasa, hígado, riñón
	Aves (no productoras de huevos para el consumo humano)	50 /músculo, piel más grasa, hígado, riñón
	Pescado	50 /músculo y piel en proporciones normales
ANTIBIÓTICOS		
Penicilinas		
Amoxicilin, ampicilina, bencilpenicilina	Todas las especies productoras de alimentos	4 /leche; 50 /músculo, grasa, hígado, riñón
Cloxacilina, docloxacilina, oxacilina	Todas las especies productoras de alimentos	30 /leche; 300 /músculo, grasa, hígado, riñón
Penetamato	Bovinos	4 /leche; 50 /músculo, grasa, hígado, riñón
	Porcinos	50 /músculo, grasa, hígado, riñón
Cefalosporinas		
Cefalexina	Bovinos	100/leche; 200/músculo, grasa, hígado; 1000/riñón
Cefazolina	Bovinos, ovinos, caprinos	50 /leche
Cefquinoma	Bovinos	20 /leche; 50 /músculo, grasa; 100 /hígado; 200 /riñón
	Porcinos	50 /músculo, piel y grasa; 100 hígado; 200/ riñón
Ceftiofur	Bovinos	100 leche; 1000 /músculo; 2000 grasa, hígado; 6000 riñón
	Porcinos	1000 /músculo; 2000 /grasa, hígado; 6000 /riñón
Quinolonas		
Danofloxacina	Bovinos (no productores de leche para el consumo humano)	30/leche; 100 grasa; 200 /músculo; 400 /hígado, riñón
	Porcinos	50 /piel y grasa; 100 /músculo; 200/hígado y riñón
	Pollo	100 /piel más grasa; 400 /hígado, riñón
Difloxacina	Pollo, pavo	300 /músculo; 400 /piel más grasa; 600/ riñón; 1900 /hígado
Enrofloxacin	Bovinos	100 /músculo, grasa, leche; 200 /riñón; 300 /hígado;
	Conejos	100 /músculo, grasa; 200 /hígado; 300 /riñón
	Porcinos	100 /músculo, piel más grasa; 200 /hígado; 300 /riñón
	Aves (no productoras de huevos para consumo humano)	100 /músculo, piel más grasa; 200 /hígado; 300 riñón
	Ovinos	100 /músculo, grasa; 200 /riñón; 300 /hígado;
Flumequina	Bovinos, ovinos (no productores de leche de consumo)	200/músculo; 300/grasa; 500/hígado; 1500/riñón
	Porcinos	200/músculo; 300/piel y grasa; 500/hígado; 1500/riñón
	Pollo	250/piel y grasa; 400/músculo; 800/hígado; 1000/riñón
	Salmónidos	600/músculo y piel en proporciones normales
Sarafloxacina	Pollo	10 /piel más grasa, hígado
	Salmónidos	30 /músculo y piel en proporciones normales
Tiamulina	Porcinos	100/músculo; 500/hígado

(Continuación). Lista de sustancias farmacológicamente activas cuyo LMR se han establecido. Reglamento del Consejo Europeo 2758/99 (Modificación del 23.12.99 del R2377/90)

Sustancia farmacológicamente activa	Especie animal	Límite máximo residual (µg/Kg) / Tejidos diana
Macrólidos		
Espiramicina	Bovinos	200 /músculo, leche; 300 /grasa, hígado, riñón
	Porcinos	250 /músculo; 1000 /riñón; 2000 /hígado
	Pollo	200 /músculo; 300 /piel más grasa; 400 /hígado
Tilmicosina	Bovinos, ovinos, porcinos	50 /músculo, grasa; 1000 /hígado, riñón
	Ovinos	50 /leche
	Pollo	75 /músculo, piel más grasa; 250 /riñón; 1000 /hígado
Tilosina	Bovinos	100 /músculo, grasa, hígado, riñón; 50 /leche
	Porcinos	100 /músculo, piel más grasa, hígado, riñón
	Aves (no productoras de huevos para consumo humano)	100 /piel más grasa, hígado, riñón
Fluorfenicol y compuestos asociados		
Florfenicol	Bovinos	200 /músculo; 300 /riñón; 3000 /hígado;
	Porcinos	300 /músculo; 500 /piel y grasa, riñón; 2000 /hígado
	Pollo	100 /músculo; 200 /piel y grasa; 750 /riñón; 2500 /hígado
Tianfenicol	Bovinos	50 /músculo, grasa, hígado, riñón, leche
	Pollo	50 /piel más grasa, hígado riñón
Tetraciclina		
Clortetraciclina	Todas las especies productoras de alimentos	100 /músculo y leche; 200/huevos; 300 /hígado; 600 /riñón
Doxiclina	Bovinos	100 /músculo; 300 hígado; 600 /riñón
	Porcinos	100 /músculo; 300 /piel más grasa, hígado; 600 /riñón
	Aves (no productoras de huevos para consumo humano)	100 /músculo; 300 /piel más grasa, hígado; 600 /riñón
Oxitetraciclina	Todas las especies productoras de alimentos	100 /músculo, leche; 300 /hígado; 600 /riñón; 200 huevos
Tetraciclina	Todas las especies productoras de alimentos	100 /músculo, leche; 300 /hígado; 600 /riñón; 200 /huevos
Ansamicina con anillo de naftaleno		
Rifaximina	Bovinos	60 /leche
Pleuromutilinas		
Valnemulina	Porcinos	50 /músculo; 100 /riñón; 500 /hígado
Lincosamidas		
Lincomicina	Bovinos	50/grasa; 100 /músculo; 150/leche; 500 /hígado; 1500 /riñón
Aminoglucósidos		
Apramicina	Bovinos	1000 /músculo, grasa; 10000 /hígado; 20000 /riñón
Otros antibióticos		
Novobiocina	Bovinos	50 /leche

Fuente: Cancho Grande, B.; M. S. García; J. Simal. 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva Actual. Cienc. Tecnol. Aliment. Vol. 3, No. 1, pp. 39-47.